



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

Análisis de la expresión del gen *phyASr* que codifica para una fitasa de la bacteria *Selenomonas ruminantium* en líneas transplastómicas de la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*.

Tesis que presenta

DANIELA ITZEL TORRES CANTÚ

En opción al título de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

Julio 2016

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Daniela Itzel Torres Cantú** titulado “**Análisis de la expresión del gen *phyASr* que codifica para una fitasa de la bacteria *Selenomonas ruminantium* en líneas transplastómicas de la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*”**, fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Santy Peraza Echeverría y la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia, dentro de la Opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente

Dr. Manuel Martínez Estévez
Coordinador de Docencia

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México, 09 de junio del 2016.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Daniela Torres

Q.B.P. Daniela Itzel Torres Cantú

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado análisis de la expresión del gen *phyASr* que codifica para una fitasa de la bacteria *Selenomonas ruminantium* en líneas transplastómicas de la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* bajo la dirección del Dr. Santy Peraza Echeverría y la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores de tesis, al Dr. Santy Peraza Echeverría y la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia, por el apoyo académico y moral que me brindaron durante el transcurso de la maestría. Sus consejos, comentarios y sugerencias siempre fueron de gran ayuda.

A mi comité tutorial: Dr. Santy Peraza Echeverría, Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia, Dr. Ángel G. Alpuche Solís y Dr. Jorge M. Santamaría Fernández, por sus valiosos comentarios y aportes técnicos brindados durante el desarrollo de este trabajo de tesis.

A mi comité revisor: Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia, Dr. Santy Peraza Echeverría, Dr. Ángel Alpuche Solís, Dra. Ileana Echevarría Machado, Dr. Jorge M. Santamaría Fernández, por su apoyo en la revisión de este trabajo de tesis.

A la Unidad de Biotecnología y al laboratorio de “Biotecnología de Microalgas y Cultivos Tropicales” del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por las instalaciones brindadas para el desarrollo de esta tesis.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas del CICY, así como a todo el personal por las facilidades brindadas para la obtención de esta tesis de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca No. 60465 otorgada para los estudios de doctorado, así como al financiamiento del proyecto de ciencia básica No. 300354 otorgado para la realización de este proyecto.

A la Q.B.A. Ileana C. Borges Argáez por el apoyo técnico brindado a lo largo del desarrollo de esta tesis. A la Dra. Ileana Echevarría Machado, por el apoyo técnico brindado en la realización de la extracción de proteínas y un extracto liofilizado de la cepa transplastómica y silvestre de *C. reinhardtii*.

A mis compañeros y amigos del laboratorio “Biotecnología de Microalgas y Cultivos Tropicales”: Miguel Ángel, Melissa, Shirley, Patricia, Maru, Anny, Merly, Ángeles e Iván por todos los momentos compartidos, así como por el apoyo moral, personal y académico que me han brindado durante estos años.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
Listado de abreviaturas.....	vii
Índice de figuras	xi
Índice de Cuadros.....	xv
RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT	xix
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	3
1. ANTECEDENTES.....	3
1.1 Producción de animales monogástricos	3
1.1.1 Producción del sector avícola, porcícola y acuícola	3
1.1.1.1 Sector avícola	3
1.1.1.2 Sector porcícola	5
1.1.1.3 Sector acuícola	6
1.1.2 Problemática y perspectiva en la producción de animales monogástricos	7
1.2 Enzimas para la alimentación animal	11
1.3 El sustrato: IP ₆	12
1.3.1 Interacción del IP ₆ con diferentes componentes del alimento.....	14
1.3.2 Causas del efecto anti-nutricional del IP ₆ en la dieta de animales monogástricos	16

1.4 Enzima fitasa	17
1.4.1 Fuentes de enzimas con actividad fitasa.....	18
1.4.2 Clasificación de enzimas fitasa	21
1.5 Hidrólisis del IP ₆ en el tracto digestivo	24
1.6 Fitasa como aditivo para la alimentación animal	25
1.7 Mercado de las enzimas para la alimentación animal	26
1.8 Mercado y producción de la fitasa.....	29
1.8.1 Producción de fitasas microbianas.....	29
1.8.2 Fitasa de <i>Selenomonas ruminantium</i>	32
1.9 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	33
1.9.1 Morfología.....	33
1.9.2 Fisiología	34
1.9.3 Aplicación de <i>C. reinhardtii</i> como modelo de estudio	36
1.9.4 Microalgas como sistemas biorreactores	39
1.9.5 <i>C. reinhardtii</i> como biorreactor para la producción de proteínas recombinantes	43
1.9.6 Transformación del cloroplasto de <i>C. reinhardtii</i>	46
1.10 JUSTIFICACIÓN.....	52
1.11 HIPÓTESIS.....	53
1.12 OBJETIVOS.....	53
1.12.1 OBJETIVO GENERAL	53
1.12.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53

1.13 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	54
1.14 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
CAPÍTULO II	77
2. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>phyASr</i> EN LÍNEAS TRANSPLASTÓMICAS DE <i>C. reinhardtii</i>.....	77
2.1 INTRODUCCIÓN.....	77
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	80
2.2.1 Cepa de <i>C. reinhardtii</i> y cultivo	80
2.2.2 Conteo celular de los cultivos de <i>C. reinhardtii</i>	81
2.2.3 Colecta celular	82
2.2.4 Diseño de oligonucleótidos	83
2.2.5 Extracción de ARN total	83
2.2.6 Síntesis de ADNc.....	85
2.2.7 Análisis de calidad del ADNc	86
2.2.8 Análisis de expresión del gen <i>phyASr</i> por RT-PCR de punto final	86
2.2.9 Eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos (<i>phyASr</i> y <i>rpl16</i>) por RT- PCR de tiempo real (QRT-PCR)	87
2.2.10 Cuantificación relativa de la expresión del gen <i>phyASr</i>	88
2.3 RESULTADOS.....	89
2.3.1 Extracción de ARN total	89
2.3.2 Análisis de la calidad del ADNc.....	89
2.3.3 Análisis de expresión del gen <i>phyASr</i> por RT-PCR de punto final.	90
2.3.4 Validación de la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos <i>rpl16</i> y	

<i>phyASr</i> mediante QRT-PCR	90
2.3.5 Cuantificación relativa de la expresión del gen <i>phyASr</i>	94
2.4 DISCUSIÓN	95
2.5 CONCLUSIONES	99
2.6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	100
CAPÍTULO III	103
3. EFECTO DEL EXTRACTO LIOFILIZADO DE UNA LÍNEA TRANSPLATÓMICA DE <i>C. reinhardtii</i> QUE EXPRESA AL GEN <i>phyASr</i> SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA LÍNEA SILVESTRE EN PRESENCIA DE IP₆.....	103
3.1 INTRODUCCIÓN	103
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	105
3.2.1 Cepa de <i>C. reinhardtii</i> y condiciones de cultivo	105
3.2.2 Comparación del crecimiento de las líneas transplastómicas de <i>C. reinhardtii</i> bajo diferentes medios con P.....	105
3.2.2.1 Conteo celular de los cultivos de <i>C. reinhardtii</i> y peso de la biomasa seca..	106
3.2.3 Obtención del extracto liofilizado de la línea transplastómica seleccionada	108
3.2.4 Efecto del extracto liofilizado de la línea transplastómica de <i>C. reinhardtii</i> sobre el crecimiento de la línea silvestre de dicha microalga en presencia de IP ₆ ..	110
3.2.4.1 Conteo celular de los cultivos de <i>C. reinhardtii</i> y peso de la biomasa seca..	110
3.3 RESULTADOS.....	113
3.3.1 Comparación fenotípica de crecimiento de las líneas transplastómicas de <i>C. reinhardtii</i> bajo diferentes medios con P	113
3.3.2 Efecto del extracto liofilizado de la línea transplastómica 25-2 de <i>C. reinhardtii</i> sobre el crecimiento de la línea silvestre de dicha microalga en	

presencia de IP ₆	115
3.4 DISCUSION	121
3.5 CONCLUSIONES	125
3.6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	126
CAPÍTULO IV	129
4.1 DISCUSIÓN GENERAL	129
4.2 CONCLUSIONES GENERALES	134
4.3 PERSPECTIVAS	135
4.4 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	137

LISTADO DE ABREVIATURAS

14FN3	Dominio 14 de la fibronectina de humano
3'UTR	Región 3' no traducible
5'UTR	Región 5' no traducible
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNg	ADN genómico
ANOVA	Análisis de varianza/Analysis Of Variance
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosomal
ATP	Adenosin trifosfato
BASF	Badische Anilin und Soda Fabrik
BPII	Buffer de fosfatos II
BPP	Fitasas β -hélice
C-	Control negativo
C+	Control positivo
c ⁷ dGTP	7-deaza-2'-5'-trifosfato de deoxiguanosina
CHCl ₃ : AIA	Cloroformo: alcohol isoamilico
CONAVE	Comité Nacional para la Vigilancia Epidemiológica
C _T	Ciclo umbral/Threshold cycle
CTBD2	Proteína de fusión que comprende el dominio de la fibronectina D2 de unión de <i>Staphylococcus aureus</i> y la subunidad B de la toxina del cólera/Fusion

protein comprising the D2 fibronectin-binding domain of *Staphylococcus aureus* and Cholera toxin B subunit

CTBVP1 Proteína de fusión que comprende la proteína VP1 del virus de la enfermedad pie y boca y la subunidad B de la toxina del cólera/Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit

dNTP Deoxinucleósido trifosfato

DSM Dutch State Mines

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético

FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations

FND Financiera Nacional De Desarrollo

FTU Unidad de actividad fitasa/Units of phytase activity

FTU kg⁻¹ Unidades de fitasa por kilogramo

g kg⁻¹ Gramos por kilogramo

Gmphy Fitasa de *Glycine max*

GRAS Generalmente considerado como seguro/Generally regarded as safe

H₂O UP Agua ultrapura

HAP Fosfatasas ácidas de histidina

HMGB1 Proteína del grupo de alta movilidad/High mobility group box 1 protein

IEC International Egg Commission

IP₃ Trifosfato

IP₄ Tetrafosfato

IP₅ Pentafosfato

IP₆ Fitato

tK₂HPO₄ Fosfato de potasio dibásico

KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio monobásico
LSD	Least Significant Difference
M-SAA	Amiloide sérico asociado a mama/Mammary-associated serum amyloid
mt+	Apareamiento positivo/positive mating-type
NEB	New England Biolabs
nt	Nucleótido
P+5'UTR	Promotor más la región 5' no traducible
PAP	Fosfatasas ácidas púrpura
pb	Pares de base
PBS	Peso de la Biomasa Seca
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa/ Polymerase Chain Reaction
Pi	Fósforo inorgánico
pI	Punto isoeléctrico
PO ₄	Fosfato
PST	Proteína Soluble Total
PTP	Proteínas fosfatasas de tirosina
qRT-PCR	RT-PCR en tiempo real
r ²	Coefficiente de correlacion
rpm	Revoluciones por minuto
RRH	Región de recombinación homóloga
RT-	Sin la adición de la transcriptasa reversa
RT+	Adición de la transcriptasa reversa
RT-PCR	Reacción en Cadena de Polimerasa-Rranscripción Reversa/Reverse

Transcription Polymerase Chain Reaction

SD Desviación Estándar

TA Tris-acetato-sin sales de fósforo

TAP Tris-acetato-fosfato

T_m Temperatura de disociación/Melting temperature

U g/mg⁻¹ Unidades por gramo/miligramo

USDA U.S. Department of Agriculture

UTRs Regiones no traducibles/Untranslated regions

VEGF Factor de crecimiento vascular endotelial/Vascular Endothelial Growth
Factor

ÍNDICE DE FIGURAS
CAPÍTULO I

Figura 1.1 Desarrollo de la producción de carne de pollo en los cuatro principales países del continente Americano entre 1990 y el 2015 (millones de toneladas) (Global Poultry Trends, 2014).	5
Figura 1.2 Producción nacional y comercio porcino del 2000 al 2014 (FND, 2014).	6
Figura 1.3 Estructura del ácido fítico a pH neutro, basado en el modelo de Anderson (Erdman, 1979).	15
Figura 1.4 Reacción química de la fitasa (Humer <i>et al.</i> , 2014).	17
Figura 1.5 Clasificación de las fitasas (Cao <i>et al.</i> , 2007).	22
Figura 1.6 Evolución del mercado de las enzimas alimenticias en el sector ganadero (Bedford y Partridge, 2010).	28
Figura 1.7 Representación morfológica de la célula de <i>C. reinhardtii</i> ; A) Imagen de microscopio óptico (100X); B) Estructura interna (Dent <i>et al.</i> 2001). F, flagelo; V, vacuola; C, cloroplasto; MO, mancha ocular; M, mitocondria; Nu, nucleolo; N, núcleo; P, pirenoide; GA, granulo de almidón; T, tilacoide (Harris, 2001).	34
Figura 1.8 <i>C. reinhardtii</i> como sistema versátil para la producción de proteínas recombinantes; a) La proteína expresada a partir del genoma del cloroplasto se acumula al interior de dicho organelo. El ambiente reducido del cloroplasto permite un correcto plegamiento de las proteínas que presentan enlaces disulfuro, lo cual no se logra fácilmente en sistemas convencionales como las bacterias; b) La proteína expresada a partir del genoma nuclear se acumula en el citosol, al menos que está presente una secuencia señal de exportación. En este caso, la proteína es dirigida al retículo endoplásmico para su translocación y procesamiento; c) y posteriormente, es dirigida al aparato de Golgi para su empaquetamiento y exportación al medio extracelular (Specht <i>et al.</i> , 2010)	43
Figura 1.9 Transformación del cloroplasto; A) en el vector de transformación, un marcador de selección (rojo) se coloca bajo el control de señales de expresión del	

plastidio (promotor, 5'UTR, 3' UTR) (se muestran en azul). La recombinación homóloga a través de las regiones flanqueantes, que son la región de recombinación izquierda (RRH izq.) y la región de recombinación homóloga derecha (RRH der.), dirigen la integración del marcador en el genoma del plastidio. El transformante resultante lleva una inserción del marcador, o una sustitución de la secuencia diana entre las dos regiones de recombinación (barra blanca); B) La integración inicial en una sola copia del plastoma poliploide es heteroplásmica. En *Chlamydomonas*, los cloroplastos individuales contienen aproximadamente cientos de copias de su genoma. Varias rondas de subclonación y selección permiten la recuperación de clones homoplásmicos. Esto es sólo posible si ninguna función esencial del plastoma ha sido interrumpida por la inserción, de lo contrario, se mantiene un estado heteroplásmico donde se conservan las copias de tipo silvestre y la secuencia de interés, con el fin de lograr un balance de selección a través del marcador y la función esencial de la célula (Day y Goldschmidt, 2011) 49

Figura 1.10 Plásmido *pChPhy* para la transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii* (Rivera-Solís *et al.*, 2013).. 50

CAPÍTULO II

Figura 2.1 A) Cámara de Neubauer; B) división de la celda de la cámara de Neubauer. En rojo se indican los cinco campos visuales utilizados para realizar el conteo de las células de *C. reinhardtii*. Los números indican el orden en el cual se realizó el conteo.... 82

Figura 2.2 Calidad del ARN total extraído de las líneas transplastómicas y la línea silvestre de *C. reinhardtii*. 89

Figura 2.3 Electroforesis de la RT-PCR del gen *rp16* para verificar la integridad del ADNc de las líneas transplastómicas y línea silvestre de *C. reinhardtii*. A) Primera réplica, B) Segunda réplica. M, marcador de 2 log (NEB); RT+ (adición de la transcriptasa reversa); RT- (sin adición de la transcriptasa reversa); C+, Control positivo (ADNg de *C. reinhardtii*); C-, control negativo. 90

Figura 2.4 RT-PCR del gen *phyASr* en las líneas transplastómicas de *C. reinhardtii*. A) Primera réplica, B) Segunda réplica. C+, Control positivo (plásmido *pChPhy* que contiene el gen *phyASr*); C-, Control negativo (H₂O UP)..... 90

Figura 2.5 Eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos del gen *rpl16*. A) curva estándar, B) curva de disociación 92

Figura 2.6 Eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos del gen *phyASr*. A) curva estándar, B) curva de disociación.. 93

Figura 2.7 Cuantificación relativa de la expresión del gen *phyASr* por qRT-PCR de las cinco líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* (n=2). La línea 13-1 fue utilizada como muestra de referencia para calcular la cantidad relativa de la expresión génica del resto de las líneas. Cada valor representa la media \pm SD de dos réplicas biológicas independientes. Las expresiones relativas del gen *phyASr* se calculó de acuerdo con el método de $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Las diferentes letras en las barras indican una diferencia significativa en los niveles de expresión entre las líneas de acuerdo con el ANOVA y la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) ($p \leq 0.05$). 94

CAPÍTULO III

Figura 3.1 Estrategia experimental para la comparación fenotípica de crecimiento de las líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* 107

Figura 3.2 Estrategia experimental para determinar el efecto del extracto liofilizado de una línea transplastómica sobre el crecimiento de la línea silvestre de *C. reinhardtii* en presencia de IP₆ como única fuente de P.. 112

Figura 3.3 A) Cultivos de las líneas transplastómicas y la línea silvestre (S) de *C. reinhardtii* al séptimo día de crecimiento en tubos Falcon conteniendo de 10 mL de medio TAP. B) Visualización de los cultivos de las líneas transplastómicas y la línea S de *C. reinhardtii* al séptimo día de crecimiento por microscopía óptica a un objetivo 40X 113

Figura 3.4 A) Cultivos de las líneas transplastómicas y la línea silvestre (S) de *C. reinhardtii* al séptimo día de crecimiento en tubos Falcon conteniendo de 10 mL de medio TA+IP₆. B) Visualización de los cultivos de las líneas transplastómicas y la línea S de *C. reinhardtii* al séptimo día de crecimiento por microscopía óptica a un objetivo 40X. 114

Figura 3.5 A) Concentración celular y B) biomasa seca de las líneas transplastómicas y línea silvestre (S) de *C. reinhardtii* al ser cultivadas en medio TAP y TA+IP₆..... 115

Figura 3.6 Visualización por Microscopía óptica (40X) de los cultivos de la línea silvestre de *C. reinhardtii* al adicionar el extracto de la línea silvestre (S) y la línea transplastómica 25-2 en medio TAP y medio TA+IP₆. (*) Extracto no estéril..... 117

Figura 3.7 A) Concentración celular y B) biomasa seca de la línea silvestre de *C. reinhardtii* al evaluar el efecto del extracto no estéril de la línea transplastómica 25-2 y de la línea silvestre (S) de dicha microalga en medio TAP y medio TA+IP₆..... 118

Figura 3.8 Visualización por Microscopía óptica (40X) de los cultivos de la línea silvestre de *C. reinhardtii* al adicionar el extracto de la línea silvestre (S) y la línea transplastómica 25-2 en medio TAP y medio TA+IP₆. (**) Extracto estéril..... 119

Figura 3.9 A) Concentración celular y B) biomasa seca de la línea silvestre de *C. reinhardtii* al evaluar el efecto del extracto estéril de la línea transplastómica 25-2 y de la línea silvestre (S) de dicha microalga en medio TAP y medio TA+IP₆. 120

ÍNDICE DE CUADROS

CAPÍTULO I

Cuadro 1.1 Producción mundial de carne de pollo (millones de toneladas) (Global Poultry Trends, 2014).	4
Cuadro 1.2 Principales enzimas utilizadas para la alimentación de animales del sector ganadero (Li <i>et al.</i> , 2012).....	12
Cuadro 1.3 Total de P y complejo IP ₆ -P en diferentes ingredientes de alimentos (Viveros <i>et al.</i> , 2000).....	14
Cuadro 1.4 Algunos ejemplos de la degradación del IP ₆ con / sin fitasa microbiana exógena.....	20
Cuadro 1.5 Comparación de fitasas microbianas de diferentes fuentes (Asgard y Shearer, 1997).....	30
Cuadro 1.6 Información comercial sobre la producción de fitasas microbianas (Hou <i>et al.</i> , 2001).....	31
Cuadro 1.7 Comparación del genoma nuclear y cloroplástico para la producción de proteínas recombinantes (Rosales <i>et al.</i> 2012).....	40
Cuadro 1.8 Promotores del cloroplasto de <i>C. reinhardtii</i> usados para la expresión de proteínas heterólogas	45
CAPÍTULO II	
Cuadro 2.1 Secuencia de oligonucleótidos de los genes <i>phyASr</i> y <i>rpl16</i>	83

RESUMEN

El fitato (IP_6) es la principal forma de almacenamiento de fósforo (P) en plantas. Las fitasas son enzimas especializadas en la hidrólisis gradual del IP_6 , y actualmente son suplementadas en el alimento de animales monogástricos para aumentar la eficiencia de digestión y absorción del P del IP_6 . *Chlamydomonas reinhardtii* es una microalga que ha sido propuesta como biorreactor para la producción de proteínas recombinantes de interés comercial, incluyendo las fitasas, ya que presenta un gran potencial para este fin.

En la presente tesis se trabajó con cinco líneas transplastómicas de *C. reinhardtii*, previamente transformadas con el plásmido *pChPhy*, que contiene el gen *phyASr* que codifica para una enzima fitasa de la bacteria ruminal *Selenomonas ruminantium*. Estas cinco líneas se analizaron para verificar la expresión del gen *phyASr* mediante RT-PCR de punto final y RT-PCR de tiempo real (qRT-PCR). Como resultado, se observó mediante RT-PCR de punto final, que a diferencia de la línea silvestre que se usó como control, todas las líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* expresaron el gen heterólogo *phyASr*. Por su parte, en la cuantificación relativa de la expresión del gen por qRT-PCR, se observó que la línea B3-3 fue la que presentó mayor nivel de expresión entre las líneas transplastómicas analizadas.

Por otra parte, y con el fin de complementar el análisis de expresión de la fitasa recombinante en *C. reinhardtii*, se evaluó el efecto del extracto liofilizado de una de las líneas transplastómicas de esta microalga, sobre el crecimiento de la línea silvestre cultivada en diferentes medios de cultivo con IP_6 en presencia o ausencia de sales de P. Para lo anterior, se eligió la línea transplastómica 25-2 para obtener el extracto liofilizado debido a que presentó mayor acumulación celular. Como resultado no se observó un efecto significativo sobre el crecimiento de *C. reinhardtii* en presencia de IP_6 . Por lo tanto, se sugiere para trabajos posteriores evaluar la acumulación de la fitasa recombinante *phyASr* en las cinco líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* que mostraron la expresión de dicho gen, así como evaluar la actividad enzimática de la fitasa en los extractos proteicos de estas líneas transplastómicas.

ABSTRACT

Phytate (IP₆) is the principal storage form of phosphorus (P) in plants. Phytases are specialized enzymes involved in the hydrolysis of IP₆, and currently they are supplemented in the feed of monogastric animals, to increase the efficiency of digestion and absorption of P from IP₆. *Chlamydomonas reinhardtii* is a microalgae that has been proposed as a bioreactor for the production of recombinant proteins of commercial interest, including phytase, which has a great potential for this purpose.

In this thesis, we worked with five transplastomic lines of *C. reinhardtii*, previously transformed with the plasmid *pChPhy*, containing the gene *phyASr* which codes for a phytase enzyme from the ruminal bacteria *Selenomonas ruminantium*. These five lines were analyzed to verify *phyASr* gene expression by end-point RT-PCR and real-time RT-PCR (qRT-PCR). As a result, it was observed by endpoint RT-PCR that, unlike the wild-type line that was used as control, all transplastomic lines of *C. reinhardtii* expressed the heterologous gene *phyASr*. When the relative expression levels of this gene were quantified by real-time RT-PCR, it was observed that the line B3-3 was the one with higher expression level among the transplastomic lines analyzed.

In order to further investigate the function of the recombinant phytase in *C. reinhardtii*, we evaluated the effect of adding the lyophilized extract of the transplastomic line 25-2 on the growth of the wild-type line cultured in different media supplemented with IP₆ in presence or absence of P salts. We observed no significant effect on the growth of *C. reinhardtii* in the presence of IP₆. Therefore, we propose in further studies to characterize the *phyASr* protein in the five transplastomic lines of *C. reinhardtii* by using Western blot and a fitase activity assay.

INTRODUCCIÓN

Debido a la presencia de factores anti-nutricionales, como el fitato (IP_6), los animales monogástricos no son capaces de digerir eficientemente el alimento, debido a que no son capaces de sintetizar las enzimas específicas para su hidrólisis, haciendo del fósforo (P) y otros elementos de valor nutricional pobremente disponible para su absorción. Por lo tanto, debido a la insuficiencia de P en la dieta, son usualmente adicionadas fuentes de fósforo inorgánico (P_i) a la alimentación de animales monogástricos, para asegurar que los requerimientos nutricionales sean cumplidos. Sin embargo, esta suplementación no solo es limitada, sino también se traduce en costos de alimentación adicional (Bedford y Partridge, 2010), ya que el P es el tercer nutriente más caro después de la suplementación de energía y proteína.

Así mismo, el adicionar fuentes de P_i a la dieta conlleva a que considerables cantidades de P de componentes de origen vegetal que no son aprovechados sean excretados, dando como resultado los actuales problemas ambientales. Por esta razón, los sistemas de producción animal se encuentran cada vez más afectados por normativas ambientales debido a la sobrecarga de las excretas producidas con cantidades excesivas de P (Bedford y Partridge, 2010).

Por ello se han implementado estrategias para enfrentar el problema de la contaminación ambiental mediante el uso de enzimas exógenas como aditivos alimenticios, con la finalidad de contribuir al aumento de la eficiencia de digestión, reducir el impacto negativo de estos nutrientes sobre la contaminación de los cuerpos receptores, y ofrecer grandes beneficios tanto al productor como al consumidor de productos de carne y huevo. Recientemente, un grupo de fosfatasas ha ganado importancia a nivel comercial como son las fitasas, las cuales son capaces de hidrolizar el IP_6 , que es la principal forma de almacenamiento de P en las semillas de las plantas, el cual es en su mayoría indigerible por animales monogástricos (Lee, 2014).

Por su parte, *Chlamydomonas reinhardtii*, es una microalga verde eucariota que ha sido utilizada tradicionalmente como modelo de estudio en procesos fisiológicos, y recientemente como biorreactor para la producción de proteínas recombinantes de interés comercial como las fitasas, así como de otras sustancias económicamente importantes (Yoon *et al.*, 2011). Lo anterior se debe a que esta microalga presenta características atractivas para este fin, como por ejemplo, su rápida multiplicación, la

rápida obtención de transformantes iniciales, la facilidad de escalamiento, así como su capacidad de crecer fototróficamente, heterotróficamente o mixotróficamente, y además tanto el genoma del núcleo (número de accesión en el GenBank NW_001843987) como el genoma del cloroplasto (Número de accesión en el GenBank BK000554) han sido secuenciados en su totalidad (Merchant *et al.*, 2007; Franklin y Mayfield, 2004).

Hasta la fecha no es de nuestro conocimiento reporte alguno donde se mencione la presencia de fitasas endógenas en alguna microalga eucariota; sin embargo, un reporte previo de nuestro laboratorio mostró la capacidad de *C. reinhardtii* para crecer en presencia de IP₆ como única fuente de P (Rivera-Solís *et al.*, 2013), lo que sugiere la presencia de al menos una fitasa hasta ahora no identificada y caracterizada en esta microalga. Estudios previos han identificado fosfatasa alcalinas en *C. reinhardtii*; sin embargo, ninguna de ellas presentó afinidad por el IP₆ (Patni *et al.*, 1977; Matagne *et al.*, 1976).

Previamente en el laboratorio se generó un plásmido (*pChPhy*) que contenía el gen *phyASr* fusionado con el promotor *atpA* y el terminador *psbA*. Dicho gen codifica para una fitasa de la bacteria anaeróbica ruminal *Selenomonas ruminantium*. Esta construcción fue concebida como una herramienta que permitió la transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii* para su uso como biorreactor en la producción recombinante de esta fitasa (Rivera-Solís *et al.*, 2013). Esta enzima fue seleccionada por presentar una alta actividad específica (400 U mg⁻¹) cuando se expresó en *E. coli*, amplio rango de pH al cual se encuentra activa (3.0 a 6.0) y resistencia a la actividad de proteasas (Cheng *et al.*, 1999).

Con el fin de investigar fuentes de fitasas menos costosas a las utilizadas actualmente, previamente en nuestro laboratorio se generaron líneas transplastómicas de la microalga verde *C. reinhardtii* que contenían al gen *phyASr*. En este trabajo se caracterizaron estas líneas para verificar la expresión de dicho gen mediante RT-PCR de punto final y RT-PCR de tiempo real (qRT-PCR). Además, se propuso la determinación indirecta del efecto de la enzima fitasa recombinante mediante la adición del extracto liofilizado de una línea transplastómica sobre el crecimiento de la línea silvestre de *C. reinhardtii*, en un medio libre de P y adicionado con I

CAPÍTULO I

1. ANTECEDENTES

1.1. Producción de animales monogástricos

1.1.1. Producción de animales del sector avícola, porcícola y acuícola

El agronegocio es un área de inversión prometedora. Hasta el año 2050, tendremos un incremento en la población mundial de aproximadamente dos mil millones de habitantes, lo que aumentará en el 70% la demanda por alimentos. Según el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), el crecimiento económico global tendrá un índice medio anual del 3.3% a lo largo de la próxima década. La demanda mundial por carne y huevo, y las importaciones, seguirán presentando un fuerte crecimiento, especialmente en muchos países de renta media y baja. El crecimiento estimado es del 1.8% al año durante la próxima década, con mayores ganancias para la carne de aves en relación a la porcina y la pesquera (CONAVE, 2015).

1.1.1.1 Sector avícola

De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la producción mundial de carnes en el 2013 alcanzó 308.3 millones de toneladas, lo que implicó un aumento del 1.4% respecto a la producción del 2012. En esta producción mundial, la de carne de aves fue la segunda en importancia representando el 34.6% del total, llegando a 106.8 millones de toneladas. Según las previsiones de Osler Desouzart, en el 2020 las carnes de aves serán las más consumidas mundialmente (CONAVE, 2015).

En el 2015 la producción mundial de carne de aves de corral se estima que superará los 97 millones de toneladas, con una ganancia del 2.0% respecto al año anterior. Se ha reportado que el continente Americano es la región con mayor producción de carne de pollo, ya que ha aumentado de 33.8 millones de toneladas en el 2006 a un estimado de 42.4 millones de toneladas en el 2015 (Cuadro 1.1). Mientras tanto, Asia ha ampliado su participación en cerca de un punto porcentual del 31.8% al 32.7%, mientras que la contribución de Europa ha pasado de algo menos del 16.0% a más del 17.0% (Global Poultry Trends, 2014).

**Cuadro 1.1. Producción mundial de carne de pollo (millones de toneladas)
(Global Poultry Trends, 2014).**

Región	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Producción de carne de pollo										
África	3.4	3.7	4.0	4.2	4.5	4.6	4.6	4.8	4.9	4.9
América	33.8	35.1	37.5	36.9	38.6	39.8	40.1	40.5	41.3	42.4
Asia	23.5	25.0	26.2	28.0	29.2	29.9	31.4	31.6	31.4	31.8
Europa	10.8	11.6	12.1	13.3	13.9	14.6	15.4	15.9	16.3	16.7
Oceanía	1.0	1.0	1.0	1.0	1.1	1.2	1.2	1.3	1.4	1.4
Mundial	72.4	76.3	80.7	83.4	87.3	90.1	92.7	94.1	95.3	97.2

El pronóstico para el 2023 por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) y la FAO se estima que la producción de carne de pollo tendrá un crecimiento anual del 2.3%, considerando que en el 2013 se produjo 107 millones de toneladas, esperando un crecimiento de alrededor de 134.5 millones de toneladas en el 2023, momento en el cual la producción totalizará alrededor de 118 millones de toneladas (Global Poultry Trends, 2014).

En la Figura 1.1 se muestra el desarrollo de las industrias de pollo de engorda de los cuatro principales países productores del continente Americano entre 1990 y el 2015, donde Estados Unidos y Brasil son actualmente uno de los mayores productores y exportadores de carne de pollo a nivel mundial, alcanzando 17 y 11.5 millones de toneladas respectivamente, lo que representa el 71.5% de la producción mundial. Mientras que la producción en los Estados Unidos se ha duplicado, la industria de México ha registrado un aumento de tres veces su nivel a partir del año 2000. De acuerdo a la USDA, se espera en el 2015 un aumento en la producción de aves de engorda en México con un récord de 3.2 millones de toneladas, debido al incremento de la inversión en la industria avícola (Global Poultry Trends, 2014).

Por otra parte, la Comisión Internacional del Huevo (IEC) estima que hay 4, 930 millones de gallinas ponedoras en el mundo, por lo que la industria del huevo a nivel global ha crecido a un ritmo del 4% anual y ha tenido ganancias de más de \$ 100, 000 millones de dólares al año. Así mismo, se estima que para el 2015 se producirán 12 millones de toneladas de huevos de mesa adicionales para suplir la demanda proyectada. Dentro de este escenario, Asia contribuirá con 62.1% de la producción global, Europa con 14.3% y Centro y Sudamérica aportarán el 9.8% (IEC, 2015).

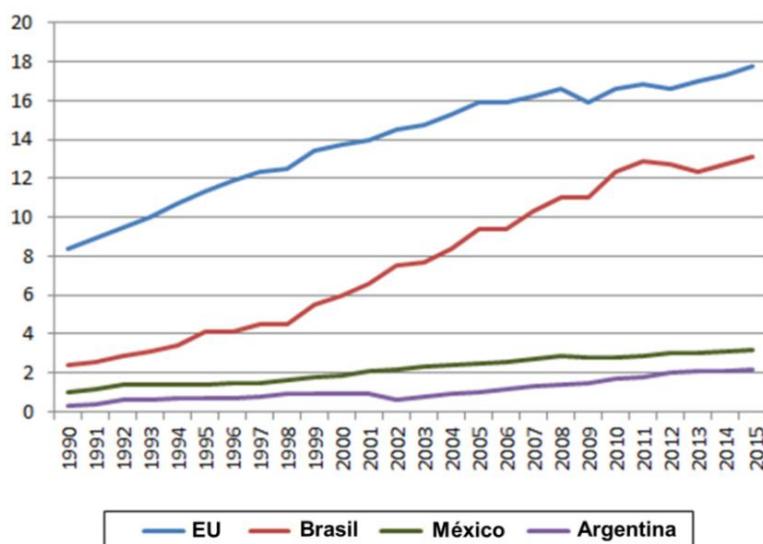


Figura 1.1 Desarrollo de la producción de carne de pollo en los cuatro principales países del continente Americano entre 1990 y el 2015 (millones de toneladas) (Global Poultry Trends, 2014).

1.1.1.2 Sector porcícola

La demanda de carne de cerdo ha ido en aumento en las últimas décadas por consecuencia de los cambios en los patrones de consumo y por el aumento de los ingresos en los países en desarrollo. La carne de cerdo se consume principalmente en Europa, Asia y América del Norte.

La producción mundial de carne porcina aumentó en promedio poco más del 19% en los últimos diez años, ascendiendo en el año 2013 a casi 108 millones de toneladas. Las regiones de China, la Unión Europea y Estados Unidos son responsables de más del 86% de la producción mundial, equivalente a 1, 086 millones de cabezas de cerdo. Dentro de la Unión Europea destacan Alemania y España como principales productores. Otros países que se destacan son Brasil, Rusia y Canadá (FAO, 2014).

Los países del Pacífico como Japón, Australia, México, Nueva Zelanda y Corea del Norte son los principales importadores de carne de cerdo, mientras que China, Estados Unidos, Canadá, la Unión Europea y Brasil son los principales exportadores (PRNewswire, 2014).

Como caso particular, dentro del subsector pecuario nacional, la porcicultura en México ocupa el tercer lugar en importancia por el valor y el volumen de producción que genera. Según la Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal

y Pesquero (FND), en el 2013 se produjeron 1.28 millones de toneladas de carne de cerdo con un valor de \$ 45, 372 millones de pesos, y en el 2014 se estimó una producción de 1.33 millones de toneladas (Figura 1.2). Por lo tanto, se dice que dicho sector presenta un dinamismo positivo, con una tasa media anual de crecimiento del 2.0% entre los años 2008 al 2013, alcanzando alrededor de 16 millones de cabeza de cerdo en el último año. Aunque todas las entidades cuentan con producción porcina, en el 2012, se registró que seis concentran el 72.3% del valor y 73.7% del volumen generado: Jalisco, Sonora, Puebla, Yucatán, Veracruz y Guanajuato (FND, 2014).

Para el 2013, el consumo nacional aparente de carne de porcina se estima en 1.9 millones de toneladas, de las cuales las importaciones representan cerca del 36%. En el mismo año las exportaciones alcanzaron poco más de 70 mil toneladas, mientras las importaciones fueron diez veces mayores, cercanas a las 700 mil toneladas (FND, 2014).

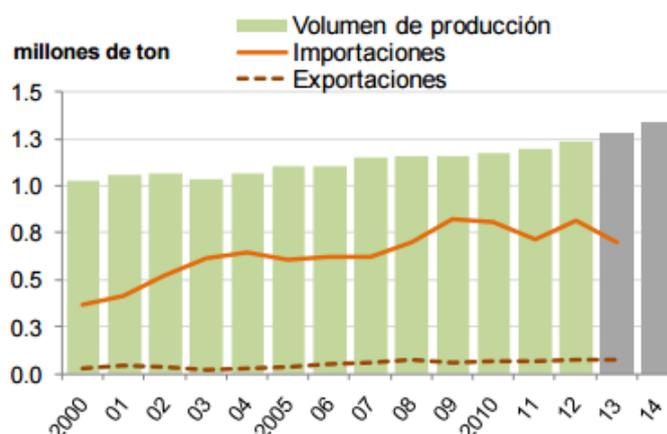


Figura 1.2 Producción nacional y comercio porcino del 2000 al 2014 (FND, 2014).

1.1.1.3 Sector acuícola

En cuanto al sector acuícola, la producción pesquera mundial ha aumentado de forma constante en las últimas cinco décadas y el suministro de peces comestibles se ha incrementado a una tasa media anual del 3.2%, superando así la tasa de crecimiento de la población mundial del 1.6%. Los mercados que demandan este producto están definidos por el consumo per cápita y los factores demográficos, es por ello que el mayor mercado de productos pesqueros del mundo es Asia, donde domina China con más de 1.2 mil millones de habitantes (FAO, 2014).

En 2010, el pescado representó el 16.7% del aporte de proteínas animales de la población mundial y el 6.5% de todas las proteínas consumidas. Las proteínas de pescado pueden representar un componente nutricional esencial en determinados países con una elevada densidad de población donde el aporte proteínico total puede ser escaso (FAO, 2014). Por consiguiente, la producción acuícola mundial alcanzó otro máximo histórico de 90.4 millones de toneladas (equivalente en peso vivo) en el 2012, lo cual correspondió a una ganancia de \$ 144, 400 millones de dólares, de los que 66.6 millones de toneladas correspondieron a peces comestibles, representando una ganancia de \$ 137, 700 millones de dólares. China produjo por sí sola 43.5 millones de toneladas de peces comestibles en ese mismo año (FAO, 2014).

En lo que respecta a México, la pesca es la actividad económica nacional que ha alcanzado un amplio desarrollo en su infraestructura productiva. El país se encuentra entre los 20 principales países pesqueros del mundo, quienes en total capturan anualmente el 80% del volumen pesquero mundial, donde los principales estados productores son: Baja California, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Tamaulipas, Veracruz, Nayarit, Guerrero y Oaxaca (Alvarado *et al.*, 2005).

Actualmente México exporta productos a Estados Unidos, Corea del Sur, Japón, España, Taiwán, entre otros países; y como principales países importadores son Estados Unidos, Chile y Colombia. En el transcurso del año 2011, las exportaciones ascendieron a \$ 1, 049 millones de dólares con 371 mil toneladas de pescados y mariscos en diversas presentaciones; mientras que la importación de productos pesqueros alcanzo un valor de \$ 679 millones de dólares y un volumen de 215 mil toneladas de producto, logrando con esto un saldo positivo de \$ 370 millones de dólares (FAO, 2012).

1.1.2 Problemática y perspectiva en la producción de animales monogástricos.

A pesar de que se busca la competitividad y posicionamiento en los mercados de exportación con productos de carne y huevo de calidad, se ha considerado implementar estrategias para enfrentar el problema de la contaminación causada por la producción animal intensiva. Esta situación ha traído como consecuencia un aumento en la capacidad contaminante de las granjas porcinas, avícolas y acuícolas en especial, en regiones donde se presenta una alta densidad de población de aves, cerdos y peces.

La agricultura animal tiene un desempeño que es clave en el sostenimiento y protección del medio ambiente, pues la producción animal resultante de la transformación de los alimentos en productos de valor, se generan a su vez, productos de desechos inevitables. Los residuos ganaderos son la mezcla resultante de los excrementos del ganado y del material sobre el cual se recogen. El incremento en el número de animales y la regionalización de las producciones han generado fuertes presiones sobre los productores animales, porque si las operaciones de producción no son manejadas adecuadamente, la descarga de materia orgánica (nutrientes, patógenos y emisión de gases) a través de los desechos pueden causar significativa contaminación del agua y el aire (Lon-Wo, 2003).

La industria avícola si bien no es, según las estadísticas, la mayor contaminante con desechos orgánicos, más no puede ser causa de complacencia porque cualquier producto de la excreción orgánica si se presenta en cantidades suficientes puede tener serias consecuencias ambientales. Wiseman (1992) estimó que 1,000 gallinas ponedoras con 2 kg de peso promedio producen 115 L de desechos por día con un contenido de humedad de 70%, mientras que 1,000 pollos de 1 kg producen 36 L por día con 30% de humedad. Más del 50% del nitrógeno (N) de los alimentos de aves es excretado como compuestos nitrogenados, que incluyen fuentes inorgánicas (sales de amonio) que son mineralizadas rápidamente en ácido úrico (40 - 70% del N total). Así mismo, con relación al fósforo inorgánico (Pi), éste puede llegar hasta el 60% del total excretado, y está asociado a la deficiencia de digestión del fitato (IP₆). Las materias primas de origen vegetal contienen alrededor de dos tercios del fósforo (P) en forma de IP₆, que es un complejo de gran resistencia al ataque de las enzimas endógenas de animales monogástricos (Lon-Wo, 2003).

Según Hatten y colaboradores (2001), el incremento de la producción avícola ocurrido en los últimos años ha determinado un mayor uso de las excretas como fertilizante, lo que ha provocado la contaminación de los cuerpos acuíferos. Con el almacenaje de las excretas y la acción de las bacterias fecales, y la acción mecánica o enzimática para el tratamiento de los desechos excretados, ocurre una rápida degradación, donde los compuestos orgánicos complejos que son relativamente inertes, se transforman en otros volátiles o reactivos. El P excretado también es liberado mediante la acción catalítica de enzimas contenidas en los microorganismos del suelo, dando lugar a los fenómenos de eutrofización de las corrientes de agua y de los reservorios acuáticos. Bajo estas circunstancias ocurre un crecimiento acelerado de algas y un agotamiento

del contenido de oxígeno del agua, lo que provoca mortalidad de la fauna acuática (Lon-Wo, 2003).

Por otra parte, en el caso de la porcicultura en México, independientemente de ser practicada en todo el país, muestra una gran concentración en pocas entidades, donde la operación de grandes grupos de productores y empresas permite ofertar grandes volúmenes de carne para el abasto interno e inclusive para la exportación. Como resultado de esto, grandes cantidades de excretas son producidas en áreas pequeñas de terreno y su distribución y descarga han acarreado problemas de contaminación al ambiente. La aplicación de grandes cantidades de excretas a potenciales tierras de cultivo puede conducir a concentraciones excesivas de minerales en cuerpos acuíferos, y su acumulación en los suelos (SAGARPA, 2000).

Asociado a lo anterior, en México, la porcicultura se ubica como la principal actividad ganadera demandante de granos forrajeros, y ocupa el tercer lugar en la demanda de pastas de oleaginosas, los cuales representan el 25.8 y el 21.9 %, respectivamente de la demanda pecuaria del año 2000. Aproximadamente un 50% de estos granos forrajeros y la mayor parte de las pastas de oleaginosas se deben importar. A nivel global, la importación de insumos alimenticios provenientes de otros países envuelve la transferencia masiva de nutrientes, contaminando a través de las excretas de los animales, el ambiente local donde estos insumos son usados para la alimentación de los animales (SAGARPA, 2000).

Por otro lado, para el caso de los sistemas de producción pesquera, se espera proporcionar todos los factores ambientales controlados tales como: temperatura, iluminación, oxígeno disuelto y pH; factores bióticos como: densidad, salinidad y una dieta con productos vegetales que cumplan con el contenido proteico y energético para el organismo; esto con el fin de alcanzar un incremento notable en el rendimiento acuícola. Sin embargo, dichos sistemas de cultivo intensivo no cumplen con las características de control con respecto a las condiciones de agua, alimentación y sanidad estricta (FAO, 2014).

Por lo tanto, aún bajo las condiciones idóneas en los sistemas de producción animal, los cerdos, aves y peces no utilizan el 100% de los nutrientes consumidos, debido a la presencia de factores anti-nutricionales en el alimento, los cuales influyen negativamente en la digestión y absorción de nutrientes. Esto se debe a que los animales monogástricos no son capaces de sintetizar enzimas específicas para la

hidrólisis de dichos factores. De la cantidad total de nutrientes consumidos por cerdos y aves, la proporción que es excretada es del 45 a 60% del N, de 50 a 80% del calcio (Ca) y P, y de 70 a 95% del potasio (K), sodio (Na), magnesio (Mg), cobre (Cu), zinc (Zn), manganeso (Mn) y hierro (Fe). Para el caso de especies acuícolas, a diferencia de los cerdos y aves, éstos excretan grandes cantidades de amonio. La cantidad de nutrimentos excretados por los animales se ve afectada principalmente por la calidad, fuente y concentración de los nutrimentos en la dieta; y el nivel y proporción de estos (FAO, 2000).

Aunque las excretas animales fueron y aún son recursos valiosos, pueden ser el mayor obstáculo en el futuro desarrollo de la industria animal, si su impacto en el ambiente no se controla adecuadamente. Por lo tanto, como parte de las perspectivas en la producción intensiva de animales monogástricos, se requiere fortalecer y consolidar esta actividad, promoviendo la diversificación y tecnificación de los sistemas de los sectores porcícola, avícola y acuícola, en la cual deberá estar orientada a incrementar su eficiencia productiva y rentabilidad económica y social. Así mismo, los productos de carne y huevo deben satisfacer estándares internacionales no solo de procesamiento post-cosecha y de su manejo, sino también brindar un beneficio al ambiente. El logro y mantenimiento de tales estándares implica un significativo incremento en los costos de producción, y en ciertos casos inhiben el potencial de mercado de estos productos.

No obstante, se espera a través de la biotecnología, implementar estrategias para cumplir con los estándares establecidos a partir de una producción a bajo costo. Con el propósito de reducir el impacto de estos nutrientes sobre la contaminación de los cuerpos receptores, y ofrecer grandes beneficios para el productor y consumidor de dichos productos ganaderos. Además, se busca la incursión y posicionamiento en los mercados de exportación, promoviendo el consumo de carne y huevo fresco de calidad, para formar parte de una industria con un alto nivel de insumos y un elevado rendimiento.

Para ello, se propone como estrategia el uso de enzimas exógenas como aditivos alimenticios para cumplir con las perspectivas anteriormente mencionadas. Diversos autores han reportado mejoras en la disponibilidad de minerales, energía y aminoácidos con el uso de enzimas alimenticias (Lon-Wo, 2003; Cain y Garling, 1995; Baruah *et al.*, 2005; Li y Robinson, 1997; Sugiura *et al.*, 2001), ya que incrementan la

actividad enzimática en el tracto gastrointestinal del animal para estimular la digestibilidad de las sustancias nutritivas del alimento.

1.2 Enzimas para la alimentación animal

Desde un enfoque general, todos los animales requieren de enzimas para digerir los alimentos, las cuales se producen ya sea de forma intrínseca, o por microorganismos presentes de forma natural en el tracto digestivo del animal. Sin embargo, el proceso de digestión no es 100% eficiente. Tal es el caso de los animales monogástricos como cerdos, aves y peces, los cuales no son capaces de digerir del 15 al 25% del alimento que consumen, debido a que los ingredientes del alimento presentan factores anti-nutricionales indigeribles que interfieren con el adecuado proceso digestivo, y/o el animal carece de enzimas específicas encargadas de degradar ciertos componentes de la alimentación (Bedford y Partridge, 2010).

Por esta razón, la suplementación con enzimas alimenticias específicas permitirá a los animales monogástricos a aumentar su eficiencia de digestión, obteniendo así, la mayor cantidad de nutrientes del alimento. Por otra parte, las enzimas para la alimentación animal ayudan a satisfacer la demanda de productos ganaderos asequibles, seguros y de alta calidad, a través del mejoramiento en su eficiencia de producción y en sus perfiles nutricionales (Bedford y Partridge, 2010).

Las enzimas para la alimentación animal brinda una serie de ventajas, tales como:

- 1) Mejoramiento en la eficiencia de digestión y reducción de costos de producción – mediante la degradación de los anti-nutrientes permitirá al animal monogástrico digerir de forma adecuada el alimento, conduciendo al aumento de carne y huevo por kilogramo de alimento.
- 2) Beneficio al ambiente – al mejorar la digestión y absorción de los nutrientes se reducirá el volumen de estiércol producido y disminuirá la excreción de P y N.
- 3) Mejoramiento de la consistencia del alimento – reduciendo la variación nutricional en los ingredientes del alimento, resultará un alimento más consistente para un crecimiento más uniforme del animal y una producción de carne y huevo de calidad.
- 4) Son proteínas, que en última instancia, son digeridas o excretadas por el animal sin dejar residuos en los productos de carne y huevo.

Las enzimas se clasifican de acuerdo al tipo de sustrato sobre el cual actúan.

Actualmente en la alimentación animal los tipos de enzimas utilizadas son aquellas que degradan fibras, proteínas, almidón e IP₆. En el Cuadro 1.2 se muestran las principales enzimas y los beneficios técnicos que ofrecen al ser aplicadas en el sector ganadero para la nutrición animal (Li *et al.*, 2012).

Cuadro 1.2 Principales enzimas utilizadas para la alimentación de animales del sector ganadero (Li *et al.*, 2012).

Enzimas principales	Beneficios técnicos
Xilanasas	Degradación del xilano para reducir la viscosidad intestinal causada por los polisacáridos no amiláceos presentes en el alimento.
Fitasas	Degradación del IP ₆ para la liberación de P, y cationes como Mg y Ca.
Proteasas (subtilisina)	Degradación de proteínas en péptidos y aminoácidos para reducir el suministro de N no proteico a la dieta animal, y así disminuir la excreción de urea al ambiente.
α-Amilasa	Digestión de almidón.
β-Glucanasa	Hidrólisis de glucanos complejos en oligómeros solubles para reducir los efectos anti-nutricionales de los polisacáridos no amiláceos del alimento (fibras).

1.3 El sustrato: IP₆

Debido a que el P es un nutriente esencial para el crecimiento animal, el organismo requiere el suficiente suministro de éste a través de la alimentación (O'Dell y Sunde, 1997). El P está involucrado en la mineralización de los huesos y participa en la regulación de las enzimas clave en el metabolismo y en varios procesos fisiológicos. Además, actúa como amortiguador intracelular para mantener un balance ácido-alcalino, y es necesario para la síntesis de proteínas y el metabolismo celular. Así mismo, el P es un componente de las membranas celulares en forma de fosfolípidos, y un componente estructural para la formación de ácidos nucleicos. También participa en la transferencia de energía en forma de trifosfato de adenosina (ATP) (Eastwood, 2003; Spears, 1999).

El cuerpo del animal contiene 4.7 g de P/kg, dependiendo la especie y etapa de crecimiento (Mahan y Shields, 1998; Hendriks y Moughan, 1993). Sin embargo, si existe una deficiencia de P durante su crecimiento y desarrollo, no solo conduce a una pobre mineralización de los huesos, sino también perjudica a importantes parámetros de producción, como la tasa de crecimiento y la masa corporal. Por lo tanto, si existe

un adecuado suministro de P a través de la alimentación se mantendrá la salud y el rendimiento del animal.

El alimento para animales monogástricos de origen vegetal, y las fuentes inorgánicas, varían ampliamente en la digestión del P. Sin embargo, uno de los principales problemas asociados con el uso de nutrientes vegetales en la alimentación de cerdos, aves y peces, es la presencia de factores anti-nutricionales como el IP₆, que es la principal forma de almacenamiento de P en tejidos vegetales o plantas. En cereales y semillas oleaginosas, que son los principales alimentos para animales monogástricos, entre el 60 al 80% del total del P se encuentra en forma de IP₆, el cual es prácticamente indigerible por la falta de enzimas intestinales para su hidrólisis durante la digestión. Por otra parte, sólo del 30 al 40% del P en tejidos vegetales no es proveniente del IP₆, permitiendo que éste se encuentra disponible en el alimento para su absorción (Lee, 2014).

En el Cuadro 1.3 se muestra el contenido total de P y el complejo IP₆-P presente en diferentes ingredientes del alimento (Viveros *et al.*, 2000).

El P total, el IP₆ así como las fitasas, están predominantemente asociados a la capa exterior de la mayoría de los granos de cereales enteros, semillas oleaginosas y leguminosas; sin embargo, su distribución difiere entre cereales. Si bien en la mayoría de las semillas oleaginosas, legumbres y cereales, el ácido fítico se encuentra principalmente en las capas de aleurona localizadas en la parte externa del endospermo. Parece no haber ninguna ubicación específica en las semillas de soya (Humer *et al.*, 2014).

Cuadro 1.3 Total de P y complejo IP₆-P en diferentes ingredientes de alimentos (Viveros *et al.*, 2000).

	Total de P (%)	IP ₆ -P (%)	Proporción (%)
Cereales			
Maíz	0.23 ± 0.01	0.18 ± 0.01	78 ± 0.01
Avena	0.29 ± 0.02	0.17 ± 0.03	59 ± 0.07
Centeno	0.34 ± 0.03	0.20 ± 0.01	59 ± 0.02
Trigo	0.29 ± 0.03	0.23 ± 0.03	79 ± 0.07
Cebada	0.31 ± 0.03	0.19 ± 0.02	61 ± 0.04
Leguminosas			
Chícharos	0.43 ± 0.01	0.24 ± 0.01	56 ± 0.01
Altramuces	0.33 ± 0.03	0.16 ± 0.04	48 ± 0.07
Frijol	0.39 ± 0.02	0.08 ± 0.01	21 ± 0.01
Soya	0.73 ± 0.01	0.33 ± 0.01	45 ± 0.01
Semillas oleaginosas			
Linaza	0.60 ± 0.01	0.34 ± 0.03	57 ± 0.01
Semillas de colza	1.05 ± 0.01	0.76 ± 0.01	72 ± 0.01
Cereales por productos			
Salvado de trigo	1.16 ± 0.01	0.88 ± 0.01	76 ± 0.01
Salvado de centeno	0.96 ± 0.01	0.73 ± 0.01	76 ± 0.01
Salvado de avena	0.83 ± 0.01	0.68 ± 0.01	82 ± 0.05

1.3.1 Interacción del IP₆ con diferentes componentes del alimento.

El ácido fítico (*myo*-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisfosfato, C₆H₁₈P₆O₂₄) posee seis grupos fosfato, los cuales están esterificados con los seis grupos hidroxilo del *myo*-inositol (Pallauf y Rimbach, 1997; IUPAC-IUB, 1978). Dicha estructura química fue propuesta por Anderson en 1914 (Figura 1.3) presentando un bajo peso molecular de 660.04 g/mol (Erdman, 1979). El ácido fítico es inestable en la forma de ácido libre (Reddy *et al.*, 1989) y se produce principalmente como un complejo unido a varios cationes metálicos, tales como Ca²⁺, Fe²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, K⁺ y Mn²⁺ (Harland y Oberleas, 1999). Estas sales se denominan IP₆ (Morris, 1986; Cheryan, 1980).

El ácido fítico es un agente quelante polianiónico que presenta una extremadamente alta carga negativa bajo condiciones intestinales (Barrientos y Murthy, 1996), teniendo la capacidad de formar complejos con cationes divalentes de importancia nutricional, especialmente: Fe²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺ y Ca²⁺ (Cosgrove e Irving, 1980). Dichos cationes

pueden formar quelatos fuertes entre dos grupos fosfato o quelatos más débiles dentro de un único fosfato (Erdman, 1979).

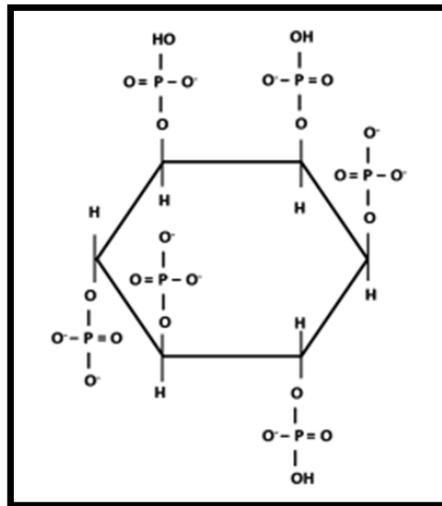


Figura 1.3 Estructura del ácido fítico a pH neutro, basado en el modelo de Anderson (Erdman, 1979).

El pH es un factor importante que influye en la solubilidad del IP₆, siendo más soluble a un valor menor que a uno mayor de pH. Por lo tanto, los complejos de ácido fítico y minerales son solubles en las condiciones ácidas del estómago. Como la precipitación tiene lugar a un pH neutro, el aumento del pH durante el paso del estómago hasta el intestino delgado conduce a la mala absorción de minerales y elementos traza debido a la formación de complejos insolubles (Schlemmer *et al.*, 2009; Selle *et al.*, 2009).

Así mismo, se ha reportado que el IP₆ afecta la digestión y absorción de proteínas y aminoácidos, debido a la formación de complejos que alteran su estructura, solubilidad, actividad enzimática y digestión proteolítica (Urbano *et al.*, 2000; Lillford y Wright, 1981). El IP₆ es capaz de formar complejos insolubles con proteínas tanto a pH ácido como alcalino, debido a que el ácido fítico puede reaccionar con proteínas de forma directa con grupos cargados positivamente o de forma indirecta con grupos cargados negativamente mediante un mineral catiónico.

Por otra parte, también se ha reportado que el IP₆ puede unirse directa o indirectamente con el almidón, e incluso inhibir la actividad α -amilasa (Knuckles y Betschart, 1987; Thompson *et al.*, 1987). El almidón puede unirse directamente a través de la formación de enlaces de hidrógeno, o indirectamente a través de proteínas asociadas con el almidón (Rickard y Thompson, 1997; Thompson *et al.*,

1987). El ácido fítico también es estructuralmente capaz de unirse con el almidón a través de enlaces fosfato (Badenhuizen, 1959), reduciendo directamente la digestión de éste. Por otra parte, como se requiere la disponibilidad de Ca^{2+} para la actividad de la amilasa, su formación en complejos de IP_6 puede conducir a la reducción de la actividad enzimática (Thompson *et al.*, 1987).

Además, el IP_6 puede interferir con la digestión de lípidos y sus derivados mediante la formación de “lipofitinas”, donde existe evidencia de interacciones del IP_6 con lípidos en maíz (Cosgrove *et al.*, 1966). Se sugirió que estos “lipofitinas” son un complejo de Ca-Mg-IP_6 , lípidos y péptidos. Por lo tanto, parece posible que el complejo Ca-IP_6 y los lípidos pueden estar involucrados en la formación de jabones metálicos en el intestino de las aves de corral, que son las principales limitaciones en la utilización de energía derivada de lípidos, particularmente grasas saturadas (Leeson, 1993; Atteh y Leeson, 1984).

1.3.2 Causas del efecto anti-nutricional del IP_6 en la dieta de animales monogástricos

El IP_6 se sintetiza a partir de *myo*-inositol a través de una serie de pasos de fosforilación, por lo tanto, consiste en un anillo de inositol con enlaces éster unidos a seis grupos fosfato (IUAC-IUB, 1989). Esta propiedad hace del IP_6 el principal compuesto de almacenamiento de P en plantas, por lo que al estar presente en el alimento de origen vegetal, es de gran preocupación, ya que éste es prácticamente indigerible por el animal monogástrico debido a la falta de enzimas específicas para su degradación, haciendo del P un elemento pobremente disponible para su absorción.

Debido a la insuficiencia de P en la dieta, son usualmente adicionadas fuentes de P_i a la alimentación de animales monogástricos para asegurar que los requerimientos nutricionales sean cumplidos. Sin embargo, esta suplementación no solo es limitada, sino también se traduce en costos de alimentación adicional, ya que en dietas de cerdos, aves y peces, el P es el tercer nutriente más caro después de la suplementación de energía y proteína. Debido al agotamiento de las reservas explotables y económicamente viables, el precio del P está aumentando a una tasa alarmante que se ha disparado de 300 a 1,500 US \$/ton (Bleux y Ruyseveldt, 2008).

Así mismo, al adicionar fuentes de P_i a la dieta, conlleva a que considerables cantidades de P de componentes de origen vegetal que no son aprovechados, sean excretados, dando como resultado los actuales problemas ambientales. Por esta

razón, los sistemas de producción de animales monogástricos se encuentran cada vez más afectados por normativas ambientales, debido a la sobrecarga de las excretas producidas con cantidades excesivas de P y N (Bedford y Partridge, 2010).

En muchos sistemas de producción animal el alimento es el de mayor costo, por lo que el efecto anti-nutricional del IP₆ no solo afecta el desarrollo y rendimiento del animal monogástrico, sino también ocasiona un aumento en la cantidad de alimento consumido, y por consiguiente, un aumento en los costos para el productor (Bedford y Partridge, 2010).

Por esta razón, se espera mediante el uso de enzimas alimenticias mejorar la eficiencia de digestión y absorción de nutrientes, así como minimizar su excreción al ambiente para una alimentación animal más sostenible, y dar beneficios económicos a la unidad de producción.

1.4 Enzima fitasa

Desde la década de 1980, la fitasa es un grupo de enzimas químicas conocida como *myo*-inositol (1, 2, 3, 4, 5, 6) fosfohidrolasa hexakisfosfato (EC 3.1.3.8, EC 3.1.3.72 y EC 3.1.3.26), la cual ha atraído considerable atención por parte de los científicos y empresarios en el área de la biotecnología. Las fitasas representan un subgrupo de fosfomonoesterasas que catalizan la hidrólisis gradual del IP₆ a fosfato inorgánico (ortofosfato, Pi) y *myo*-inositol (Figura 1.4) (Humer *et al.*, 2014). También el término fitasa se describe como una clase de fosfatasas con la capacidad de liberar *in vitro* al menos un grupo fosfato a partir de IP₆ (Haefner *et al.*, 2005).

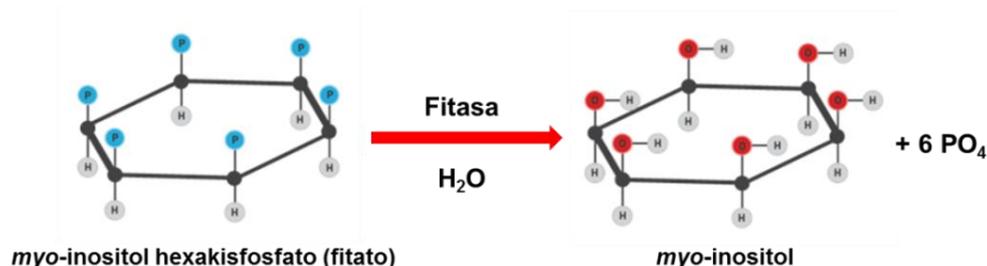


Figura 1.4 Reacción química de la fitasa (Humer *et al.*, 2014).

La actividad fitasa estandarizada es medida como una unidad de fitasa, la cual se define como la cantidad de fitasa que libera 1 mmol de fosfato inorgánico por minuto a partir de 0.0051 mol L⁻¹ de IP₆ de sodio, a un pH de 5.5 y a una temperatura de 37°C.

La unidad fitasa es comúnmente abreviado como FTU, pero también han sido utilizadas otras abreviaciones como FYT, U y PU (Li *et al.*, 2014).

La fitasa cataliza la eliminación gradual de los grupos fosfato del ácido fítico. La eliminación de los grupos fosfato se inicia con un ácido fítico completamente fosforilado (IP₆), seguido de penta- (IP₅), tetra- (IP₄), tri- (IP₃), di- y mono-ésteres de inositol, de preferencia en orden descendente. Esto significa que las fitasas primero hidrolizan todo ácido fítico totalmente fosforilado a penta-ésteres de inositol, antes de que este último sea hidrolizado a tetra-ésteres de inositol, y así sucesivamente. En una situación ideal, el resultado sería una completa hidrólisis a un *myo*-inositol y grupos fosfato (más aminoácidos, minerales y otros nutrientes que están relacionados con el IP₆). Sin embargo, en una situación *in vivo*, la hidrólisis será incompleta y por lo tanto normalmente el resultado es una mezcla de ésteres de inositol-fosfato (por ejemplo, IP₅, IP₄, IP₃) (Yu *et al.*, 2012; Wyss *et al.*, 1999).

Existen varios factores que pueden influir en la actividad de la fitasa *in vivo*, los cuales incluye a los factores relacionados con la enzima, tales como el pH óptimo y el rango de temperatura óptimo, el tipo de fitasa, y la resistencia a las proteasas. También incluye los factores relacionados con el animal, como la especie, la edad y su tiempo de retención; así mismo, los factores relacionados con la dieta, como el contenido de IP₆, los niveles de Ca y la composición de los ingredientes (por ejemplo, tipo de sustrato y la actividad intrínseca de la fitasa) (Li *et al.*, 2014).

1.4.1 Fuentes de enzimas con actividad fitasa

Las enzimas fitasas han sido identificadas en plantas, microorganismos y en algunos tejidos animales (Konietzny y Greiner, 2002). En general, existen cuatro posibles fuentes de enzimas con actividad fitasa relacionadas con la nutrición de animales monogástricos, estos incluyen: la fitasa endógena generada por la mucosa del intestino delgado, la fitasa presente en la microflora (principalmente del intestino grueso), la fitasa intrínseca de plantas y la fitasa microbiana exógena (Selle y Ravindran, 2007).

Se ha reportado que la actividad fitasa presente en el estómago y en el intestino delgado de cerdos, es insignificante (Yi y Kornegay, 1996; Jongbloed *et al.*, 1992). Se sugiere que dicha actividad proveniente de la mucosa, es debida a una manifestación de la actividad ácida no específica de la enzima o de una actividad fosfatasa alcalina

(Angel *et al.*, 2002). Debido a la muy baja actividad fitasa, se han desencadenado los actuales problemas de contaminación por la producción excesiva de P en las excretas. Las fitasas producidas por microorganismos del tracto digestivo (microflora) pueden ser muy eficientes en la degradación del IP₆, como se ha demostrado por la completa disponibilidad de P vegetal de los animales poligástricos (rumiantes). No obstante, el ecosistema microbiano en animales monogástricos se localiza principalmente en el intestino grueso, y se asume que la mayoría del P liberado del IP₆ no es absorbido, sino es excretado después de su liberación por los microorganismos (Rodehutschord, 2001).

Se ha sabido durante más de 60 años que las fitasas intrínsecas en plantas tienen la capacidad de hidrolizar el IP₆ (Hill y Tyler, 1954; Peers, 1953). No obstante, la actividad fitasa es limitada debido a su contenido altamente variable entre especies de plantas. Así mismo, se ha reportado por Eeckhout y de Paepe (1991) que las fitasas de plantas presentan una actividad menor que el de las fitasas microbianas en el tracto digestivo del animal monogástrico. También se ha reportado que las fitasas de plantas son muy lábiles al calor donde su actividad puede reducirse significativamente o incluso eliminarse cuando los ingredientes del alimento se someten a altas temperaturas, por ejemplo, durante el proceso de granulación (Kornegay, 2001; Eeckhout y de Paepe, 1994; Jongbloed y Kemme, 1990).

Por otro lado, las fitasas microbianas que son aisladas de numerosas bacterias, levaduras y hongos, son consideradas enzimas exógenas ideales para su aplicación en la nutrición animal, ya que son capaces de mantener su actividad en un amplio rango de pH, son estables a altas temperaturas, y tienen una alta especificidad hacia el sustrato (Cao *et al.*, 2007). Aunque la actividad fitasa se detectó por primera vez en el salvado de arroz por Suzuki y colaboradores (1907), no fue hasta 1971 que Nelson y colaboradores fueron los primeros en reportar la hidrólisis del IP₆ mediante la acción de una fitasa microbiana exógena del hongo *Aspergillus*. Sin embargo, no fue sino hasta 1991 que la primera enzima fitasa para la alimentación animal llegó a estar disponible comercialmente, que fue en gran parte en respuesta a la legislación destinada a limitar la contaminación del ambiente por el exceso de P en las áreas de producción animal intensiva (Selle y Ravindran, 2007).

En el Cuadro 1.4 se mencionan algunos estudios que demuestran la degradación del IP₆ al adicionar fitasas microbianas exógenas en la dieta de animales monogástricos.

Cuadro 1.4 Algunos ejemplos de la degradación del IP₆ con / sin fitasa microbiana exógena.

Fuente de la fitasa	Adición de la fitasa (FTU Kg ⁻¹)	Digestión		Animal monogástrico	Dieta	Ref.
		- fitasa	+ fitasa			
<i>A. niger</i>	1500	96	59.7	Cerdos (37 kg)	Maíz-harina de soya	Jongbloed <i>et al.</i> 1992
	1500	-1.4	74			
<i>A. niger</i>	900	14.9	53.2	Cerdos (37 kg)	Maíz-harina de soya	Kemme <i>et al.</i> 1999
<i>A. niger</i>	500	16.2	51.4	Cerdos	Maíz-tapioca-harina de soya	Seynaeve <i>et al.</i> 2000
<i>E. coli</i>	500	11.1	58.6	Cerdos (20 kg)	Maíz-harina de soya	Zeng <i>et al.</i> 2014
	1000	11.1	64.1			
<i>Citrobacter braakii</i>	1107	39.1	67.7	Cerdos (22 kg)	Maíz-harina de soya-salvado de trigo-harina de colza	Rutherford <i>et al.</i> 2014
	2215	39.1	70.8			
<i>A. niger</i>	1000	16.1	62.5	Pollos	Maíz-harina de soya	Liebert <i>et al.</i> 1993
	1000	23	65.4			
<i>A. niger</i>	500	28	59.3	Pollos machos	Trigo-harina de soya-canola	Wu <i>et al.</i> 2004
	1000	28	63.5			
	1500	28	69.7			
	2000	28	79.1			
	500	27.2	51.9	Pollos hembras	Trigo-harina de soya-canola	
	1000	27.2	55.6			
	1500	27.2	70.9			
	2000	27.2	71.5			
<i>A. ficuum</i>	500	69.2	79.5	Pollos machos	Maíz-harina de soya	Tamim <i>et al.</i> 2004
<i>P. lycii</i>	500	69.2	76.2			
<i>A. ficuum</i>	500	25.4	58.9			
<i>P. lycii</i>	500	25.4	44.9			
<i>Buttiauxella</i>	1000	51.4	88.4	Pollos machos	Maíz-harina de soya	Amerah <i>et al.</i> 2014
	1000	40.4	75.2			
	1000	43.7	76.2			
	1000	39.8	75.9			

<i>A. niger</i>	250	21.6	54.2	Gallinas ponedoras (24 semanas)	Maíz-harina de soya- sémola de maíz-harina de girasol	Van der Kils <i>et al.</i> 1997
	250	21.7	59			
	500	21.7	71.7			
	250	8.1	49.6			
	500	8.1	66.1			
<i>A. niger</i>	500	-	20.0	Peces (<i>Cyprinus carpio</i>)	Harina de soya	Schafer y Koppe, 1995
	1000	-	40.0			
<i>A. niger</i>	500	-	60.0	Peces (<i>Carassius carassius</i>)	Harina de soya	Yu y Wang, 2000
	1000	-	80.0			
<i>A. niger</i>	4000	27.0	90.0	Peces (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Maíz- cebada	Sugiura, 2001

1.4.2 Clasificación de las fitasas

Las fitasas son un grupo diverso de enzimas que abarcan una gama de tamaños, estructuras y mecanismos catalíticos. Basado en el mecanismo catalítico, son reconocidas cuatro clases diferentes de fitasas: las fosfatasas ácidas de histidina (HAP), las fosfatasas β -hélice (BPP), las proteínas fosfatasa de tirosina (PTP) y las fosfatasas ácido púrpura (PAP) (Greiner, 2006; Mullaney y Ullah, 2003).

Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada y la Unión Internacional de Bioquímica (IUPAC-IUB), las enzimas fitasas para alimentación animal se dividen en dos categorías en base al carbono del anillo de *myo*-inositol del IP₆ en el cual la desfosforilación es iniciada. La 3-fitasa (EC 3.1.3.8) inicia la hidrólisis del IP₆ en la posición C3, mientras que la 6-fitasa (EC 3.1.3.26) preferiblemente comienza en la posición C6, y la 5-fitasa (E.C. 3.1.3.72) en la posición C5 del anillo *myo*-inositol hexafosfato (Selle *et al.*, 2006). En teoría, la hidrólisis enzimática del IP₆ genera una serie de ésteres de fosfato de *myo*-inositol (IP₆ \Rightarrow IP₅ \Rightarrow IP₄ \Rightarrow IP₃ \Rightarrow IP₂ \Rightarrow IP₁), a través de reacciones progresivas de desfosforilación para producir inositol y seis fósforos inorgánicos (Selle y Ravindran, 2007).

Las enzimas que degradan IP₆ también se pueden dividir en dos tipos en base al pH

óptimo, como las enzimas ácidas que degradan el IP₆ a un pH óptimo de alrededor de 5.0, y las enzimas alcalinas que degradan el IP₆ a un pH óptimo de alrededor de 8.0 (Konietzny y Greiner, 2002) (Figura 1.5). La mayor parte de las enzimas que degradan IP₆ pertenecen al tipo ácido. Sin embargo, es importante considerar que las fitasas de diferente origen pueden diferir en su bio-eficacia por unidad (Cao *et al.*, 2007).

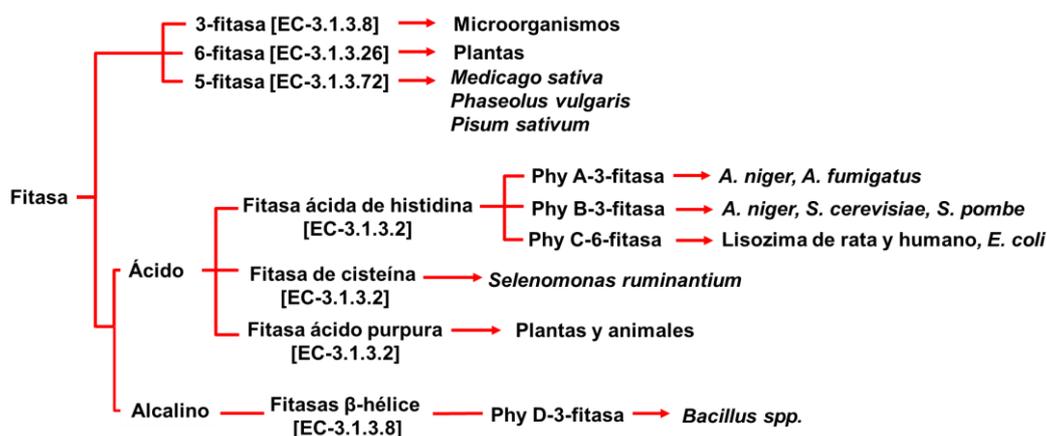


Figura 1.5 Clasificación de las fitasas (Cao *et al.*, 2007).

a) Fosfatasas ácidas de histidina (HAP). Actualmente la mayoría de las fitasas estudiadas y comercialmente disponibles pertenecen a la subfamilia de las fosfatasas ácidas de histidina. Dichas enzimas no requieren ningún co-factor para llevar a cabo la actividad catalítica. Las HAPs comparten un motivo altamente conservado RH(G/N)XRXP, considerado como el sitio aceptor del fosfato cerca de la región N-terminal (Lindqvist *et al.*, 1994). Además, contienen un motivo-HD conservado cerca de la región C-terminal en el que el aspartato es el donante de protones para el grupo sustrato saliente (Lindqvist *et al.*, 1994; Porvari *et al.*, 1994). Los inhibidores más potentes de las HAPs son Zn²⁺, fluoruro, molibdato, wolframato, vanadato y ortofosfato (producto de la hidrólisis) (Konietzny y Greiner, 2002). Las HAPs muestran una amplia especificidad hacia el sustrato, e hidrolizan IP₆ libre de metales a un pH ácido, produciendo monofosfato de *myo*-inositol como el producto final.

b) Fosfatasas β-hélice (BPP). Una amplia gama de funciones catalíticas se le ha atribuido a las proteínas que poseen la arquitectura molecular β-hélice (Pons *et al.*, 2003). No presenta la secuencia motivo RH(G/N)XRXP, por lo tanto, no es miembro de las HAPs. (Cheng y Lim, 2006). Las BPP requieren de Ca²⁺ para la actividad catalítica y termoestabilidad (Kim *et al.*, 1998). Estas fitasas emplean dos sitios de unión a

fosfato, un sitio de escisión para la hidrólisis del sustrato y un sitio de afinidad para unirse al sustrato (Shin *et al.*, 2001).

Las BPPs comparten un rango óptimo de pH con algunas fitasas vegetales alcalinas. Ambas tienen una especificidad estrecha hacia el sustrato y sólo liberan tres grupos fosfato a partir de ácido fítico produciendo inositol trifosfato como producto final. No hay aplicaciones comerciales disponibles hasta el momento para las BPPs (Bedford y Partridge, 2010).

c) Fosfatasas ácido púrpura (PAP). Se ha reportado que esta clase de fitasa también carece del motivo HR(G/N)XRXP de las HAPs (Chu *et al.*, 2004), exhibiendo su actividad catalítica óptima en un medio ácido. Las PAPs contienen un centro binuclear Fe (III)-Me (II), donde Me puede ser Fe²⁺, Mn²⁺ o Zn²⁺. Las PAPs con actividad fitasa se han reportaron en *Medicago trunculata* L. (Xiao *et al.*, 2005), trigo (*Triticum aestivum* L.) (Rasmussen *et al.*, 2007) y cebada (*Hordeum vulgare* L.) (Dionisio *et al.*, 2007). Así mismo, seis genes homólogos PAPs se identificaron y caracterizaron *in silico* en *Chlamydomonas reinhardtii* (CrPAP1 a CrPAP6), donde se observó una expresión constitutiva para los genes CrPAP2, CrPAP3, CrPAP4, y CrPAP6, mientras que CrPAP1 y CrPAP5 fueron inducidos por la adición de IP₆ en un medio sin sales de fosfato (Rivera *et al.*, 2013). Hasta ahora las PAPs con actividad fitasa parecen limitarse solo a plantas y organismos fotosintéticos.

d) Proteínas fosfatasa de tirosina (PTP). Es una superfamilia de enzimas que ha sido descubierta en el rango procariótico. El sitio activo tiene una secuencia motivo, HC(X)₅R, que es requerida para su actividad, la cual consiste de un mecanismo general ácido-base de desfosforilación. Recientemente, se reportó la primera enzima PTP de la bacteria ruminal anaeróbica *Selenomonas ruminantium* (Chu *et al.*, 2004). El rango de temperatura óptimo de dicha enzima oscila entre 50 - 55 °C con una actividad óptima en el intervalo de pH de 4.0 a 5.0. Esta enzima no necesita ningún co-factor para la actividad enzimática. No obstante, se observó que los cationes de plomo mejoraron su actividad, mientras que Fe²⁺, Fe³⁺, Hg²⁺ e iones Zn²⁺ inhibieron fuertemente la enzima. La fitasa de *S. ruminantium* comparte el sitio activo con la secuencia motivo conservado HCXXGXXR(T/S) y otras similitudes importantes con las fosfatasas de cisteína. Esta enzima cataliza la desfosforilación del ácido fítico a *myo*-inositol monofosfato (Chu *et al.*, 2004).

1.5 Hidrólisis del IP₆ en el tracto digestivo

El pH óptimo y el perfil de la actividad enzimática de las fitasas que son suplementadas en el alimento, generalmente determinan su capacidad para desarrollar la actividad catalítica en los compartimentos gastrointestinales. Existen dos tipos principales de fitasas que han sido identificadas: las fitasas ácidas que muestran máxima desfosforilación del IP₆ a un pH de alrededor de 5.0 y las fitasas alcalinas a un pH de alrededor de 8.0 (Konietzny y Greiner, 2002). Con respecto a la desfosforilación del IP₆ en el tracto gastrointestinal de los animales monogástricos, es importante considerar el bajo pH del buche de las aves (pH 4.0 a 5.0), el proventrículo y molleja de éstas y el estómago de los cerdos y peces (pH 2.0 a 5.0) (Simon e Igbasan, 2002). En cambio, el intestino delgado de los animales monogástricos presenta un pH neutro de 6.5 a 7.5.

Como se mencionó anteriormente, las fitasas utilizadas como suplementos para la alimentación animal, actualmente pertenecen a la clase de las HAPs. Por lo tanto, se espera que dichas enzimas actúen de forma más eficiente en las condiciones presentes en el estómago del animal monogástrico. Kemme y colaboradores (2006), observaron una muy baja detección de la degradación del IP₆ en el estómago y el duodeno proximal de cerdos, presentando una muy baja actividad fitasa intrínseca de 35 FTU/kg. Sin embargo, se detectó una alta degradación y una mayor hidrólisis de inositol tetra- (IP₄) y pentafofosfato (IP₅), al suplementar la dieta con un alto nivel de fitasa.

La formación de inositol fosfatos menos fosforilados, y por lo tanto, más solubles (IP₅, IP₄) mejora la susceptibilidad para la hidrólisis enzimática y acelera la siguiente degradación a inositol tri- (IP₃) y difosfato (IP₂). Mientras menos fosforilado esté el inositol fosfato, menor es la capacidad de unión con minerales. Por lo tanto, la hidrólisis del IP₆ en el estómago, aumentará la absorción intestinal de minerales esenciales y elementos traza (Schlemmer *et al.*, 2009). Así mismo, mientras menor sean los ésteres de IP₆, se disminuirá su capacidad de unión al Ca²⁺, y por lo tanto permanecería soluble, incluso a un pH más alto (Luttrell, 1993).

Como parte de los estudios mencionados anteriormente, también se ha reportado que el principal sitio de acción de las fitasas que son suplementadas en la alimentación de cerdos y peces, ocurre en el estómago (Yan *et al.*, 2002; Yi y Kornegay, 1996). Por otra parte, el sitio de acción de las fitasas en el tracto gastrointestinal de las aves ha

recibido poca atención. Sin embargo, se ha reportado que el alimento es probablemente el principal sitio de la desfosforilación del IP_6 por la fitasa (Selle y Ravindran, 2007). Para que una fitasa sea activa en el intestino delgado, debe tener alta estabilidad bajo diferentes condiciones de pH, tanto en el estómago como en el intestino; así como una alta resistencia a las actividades proteolíticas, principalmente, el de la pepsina en el estómago y el de las proteasas pancreáticas en el intestino delgado. Para garantizar una eficiente desfosforilación del IP_6 en el alimento y en el estómago, la enzima debe ser estable en un ambiente ácido y ser resistente a la pepsina. Ambas propiedades también son consideradas importantes para la adición de las fitasas ácidas en la alimentación animal.

1.6 Fitasa como aditivo para la alimentación animal

Actualmente la presión económica se coloca sobre los sistemas de producción animal, el cual exige la utilización eficiente de la alimentación por parte del animal monogástrico para disminuir los costos totales de dicho sistema. Recientemente el mercado ha demostrado claramente que las enzimas hidrolíticas han surgido como suplemento alimenticio, con el fin de mejorar la digestión y absorción de nutrientes pobremente disponibles en la dieta animal. Los primeros productos comerciales de la fitasa fueron lanzados al mercado en el año 1991. Las fitasas han sido principalmente, si no únicamente, utilizadas como aditivos para la alimentación de animales monogástricos, principalmente, para cerdos (Selle y Ravindran, 2008) y aves (Selle y Ravindran, 2007), y en cierta medida para peces (Debnath *et al.*, 2005).

El intestino delgado de animales monogástricos tiene una capacidad muy limitada para hidrolizar el IP_6 (Iqbal *et al.*, 1994) debido a la falta de actividad fitasa endógena y por una baja población microbiana en la parte superior del tracto digestivo. Esto explica por qué el P del IP_6 está escasamente disponible para el animal monogástrico (Walz y Pallauf, 2002). El P es absorbido como ortofosfato, por lo tanto, la utilización de P del complejo de IP_6 dependerá, en gran medida, de la hidrólisis de éste. Numerosos estudios han demostrado la eficacia de la fitasa microbiana como aditivo para mejorar la utilización de fosfato a partir de IP_6 (Adeola *et al.*, 2006; Esteve-García *et al.*, 2005; Augspurger *et al.*, 2003; Simons *et al.*, 1990). Por lo tanto, al adicionar cantidades adecuadas de fitasa en la dieta para animales monogástricos, se reduce la necesidad de suplementación de ortofosfato en la alimentación, lo que conlleva a una reducción en la excreción de fosfato de hasta un 50%, que es claramente un beneficio desde el

punto de vista ambiental. Es por ello que la suplementación con una fitasa microbiana, ha demostrado ser la herramienta más eficaz para la industria animal, ya que es capaz de reducir la excreción de fosfato de residuos animales, permitiendo cumplir con la normativa ambiental. Así mismo, se ha reportado que la suplementación de la fitasa puede mejorar la disponibilidad y utilización de minerales, aminoácidos y energía por el animal monogástrico (Bedford y Partridge, 2010).

Los preparados enzimáticos con fitasas de *Aspergillus niger*, *Peniophora Lycii*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Escherichia coli* están comercialmente disponibles. En general, su producción a gran escala se basa en el uso de cepas recombinantes de hongos filamentosos y levaduras. Además, las fitasas tipo silvestre no son las únicas formas producidas, existen enzimas modificadas genéticamente que exhiben mayores propiedades favorables en cuanto a su aplicación como suplemento alimenticio. Actualmente, todas las fitasas utilizadas para la aplicación en la alimentación animal pertenecen a la clase de las *HAPhys*; en el caso de las *BPPhys* se han considerado para varias aplicaciones. Sin embargo, no están actualmente disponibles en el mercado. Además, ni las *PTPs* ni las *PAPhys* están comercialmente disponibles, a pesar de que han sido objeto de varios estudios (Bedford y Partridge, 2010).

1.7 Mercado de las enzimas para la alimentación animal

En los últimos años se han hecho esfuerzos considerables para mejorar el valor nutritivo del alimento animal a través de la suplementación con enzimas exógenas. En la década de 1980, la introducción de la tecnología de enzimas alimenticias ha revolucionado la industria porcícola, avícola y acuícola. Actualmente, el mercado mundial de las enzimas alimenticias es un segmento prometedor en la industria agropecuaria con una producción mundial anual superior a 600 millones de toneladas. Dicho mercado alcanzó alrededor de \$ 344 millones dólares en el 2007, y se espera que llegue a \$ 727 millones dólares en el año 2015 y a \$ 1, 280.1 millones de dólares en el 2019 (Twomey *et al.*, 2003).

Uno de los avances más importantes en la producción de enzimas alimenticias se produjo en la década de 1990 con la introducción de la enzima fitasa para la nutrición animal. El beneficio ambiental que ofrece la fitasa al reducir la excreción del P por cerdos, aves y peces, fue el factor clave para su adopción en el mercado, ya que la legislación existente demanda minimizar el impacto negativo de la producción animal al ambiente. El uso de la fitasa permite a los productores de alimentos reducir la

cantidad de Pi que debe ser adicionado a la dieta, con la finalidad de satisfacer solo las necesidades de P requerido por el animal monogástrico. Así mismo, mediante la reducción de los costos de alimentación y el mejoramiento de la eficiencia de digestión del P, la fitasa tiene que ser competitiva en costos frente al Pi. A medida que el número de proveedores de fitasa ha aumentado con el tiempo, la erosión de precios de la creciente competencia, junto con mejoras en la producción de la fitasa, ha reducido radicalmente el costo de la fitasa para su uso en la alimentación de cerdos, aves y peces. En consecuencia, el beneficio económico de la fitasa en términos de reducción de los costos de alimentación, se ha vuelto muy atractivo y es ahora el principal factor para su uso en la alimentación en comparación con sus beneficios ambientales (Bedford y Partridge, 2010).

Recientemente, los proveedores de enzimas están promoviendo los beneficios del uso de la combinación de las enzimas fitasa y carbohidrasa en la alimentación, con el fin de reducir aún más los costos de producción animal. Cada tipo de enzima es dirigido a diferentes anti-nutrientes presentes en la dieta, por lo tanto, la adición de una combinación de actividades enzimáticas permite la liberación y disposición de mayor cantidad de nutrientes como aminoácidos, minerales, y energía, en comparación al empleo de estas enzimas de forma aislada (Bedford y Partridge, 2010).

El mercado de las enzimas de alimentación animal ha crecido a una tasa promedio del 13% por año durante el período 1998 - 2008 (Freedonia, 2009). Las enzimas para la alimentación animal son ahora ampliamente utilizadas para mejorar, principalmente, la nutrición de cerdos y aves. Actualmente el mercado de las enzimas tiene un valor mayor a \$ 650 millones de dólares. Sin embargo, el uso de las enzimas para la alimentación animal en el sector acuicultura, es aún muy bajo, y en los rumiantes, es inexistente. La Figura 1.6 resume la evolución de los productos de las enzimas alimenticias para diferentes aplicaciones desde principios de 1990 (Bedford y Partridge, 2010).

El mercado de las enzimas alimenticias está dominado por cuatro empresas importantes: Danisco Animal Nutrition, Novozymes/DSM, BASF y Adisseo, las cuales se estima que representan el 70% del mercado. Sin embargo, hay otras empresas en el mercado que incluyen, AB Vista, Alltech, Beldem, ChemGen, Kemin y una gran variedad de proveedores chinos.

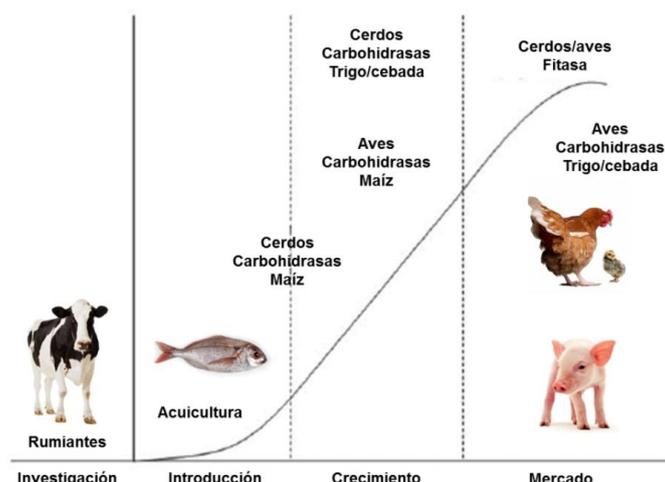


Figura 1.6 Evolución del mercado de las enzimas alimenticias en el sector ganadero (Bedford y Partridge, 2010).

Danisco Animal Nutrition (Reino Unido), anteriormente llamado Finnfeeds International Ltd., fue pionera en el desarrollo de las enzimas alimenticias en la década de 1980. Sus productos enzimáticos incluyen actualmente, Phyzyme fitasa XP y una gama de productos basados en carbohidrasas/proteasas - Avizyme® (aves de corral), Porzyme® (cerdos) y Grindazym® (cerdos y aves de corral) (Bedford y Partridge, 2010).

Las empresas Novozymes (Dinamarca) y DSM (Países Bajos) formaron una estratégica de alianza en el 2001. DSM es responsable de las ventas, comercialización y distribución de las enzimas para la alimentación animal de Novozymes. Actualmente, sus productos enzimáticos incluyen la proteasa RONOZYME® ProAct, la fitasa RONOZYME® P y una gama de productos a base de carbohidrasas comercializado bajo las marcas RONOZYME® y Roxazyme®. Novozymes reportó 744 millones de ventas de enzimas para la alimentación animal en el 2008 (Novozymes, 2009a). Como empresa química líder en el mundo, los productos de enzimas alimenticias de BASF incluyen Natuphos® (fitasa) y Natugrain® (carbohidrasa). Recientemente, la mayoría de las ventas de las enzimas alimenticias de BASF están dentro del segmento de la fitasa (Bedford y Partridge, 2010).

Adisseo (Francia) se especializa en proporcionar aminoácidos, vitaminas y enzimas para la industria de la alimentación animal. Sus recientes productos de enzimas alimenticias son Rovabio™ Excel (carbohidrasa) y Rovabio™ Max (carbohidrasa y

fitasa). La mayoría de las ventas de las enzimas de alimentación de Adisseo están dentro del segmento de carbohidrasa (Bedford y Partridge, 2010).

1.8 Mercado y producción de la fitasa

Las tendencias recientes del mercado han demostrado claramente que las enzimas son excelentes aditivos alimenticios. Las enzimas para la alimentación animal son el producto más nuevo en el mercado con ganancias de más de \$ 50,000 millones de dólares (Twomey *et al.*, 2003).

Uno de los avances más importantes en la industria agropecuaria se produjo en 1991 por Gist Brocades (ahora DSM) con la introducción en el mercado de la enzima fitasa para la alimentación animal, la cual se conoce actualmente como Natuphos de la empresa BASF. Dicho producto está disponible como polvo, granulado o líquido. La patente de Gist Brocades describe una cepa mutante de *Aspergillus niger* con una sobreproducción de la enzima fitasa, donde se observó un incremento en la actividad 50 veces mayor comparada a la cepa silvestre (van Gorcom *et al.*, 1990).

Las primeras fitasas producidas en una escala comercial fueron derivadas de cepas de hongos modificadas genéticamente mediante la tecnología de ADN recombinante. Sin embargo, la eficacia de estos suplementos de fitasa es aun baja, debido a que no se cumplen con todas las características deseables como “fitasa ideal” para su aplicación en la industria. Para lograrlo, la fitasa 1) debe ser activa en el tracto digestivo, principalmente el estómago; 2) debe ser termoestable durante el procesamiento del alimento para animales (granulación) y durante el almacenamiento; 3) debe ser fácilmente procesado por el fabricante de alimentos para su idoneidad como aditivo; 4) debe ser eficaz en la liberación de P a partir del Pi en el tracto digestivo; 5) debe ser estable a las proteasas (tripsina y pepsina); y 6) presentar un bajo costo de producción (Bedford y Partridge, 2010).

1.8.1 Producción de fitasas microbianas

La fitasa está ampliamente distribuida entre varias formas de vida, entre ellas, los microorganismos son los sistemas con mayor eficacia y desarrollo, seguido de las plantas. Los hongos filamentosos, tales como *Aspergillus ficuum*, *Mucor piriformis* y las especies de *Cladosporium* son las principales fuentes de fitasas microbianas (Stefan *et al.*, 2005). Estas fitasas son estables incluso a valores de pH por encima de 8.0 y

por debajo de 3.0 (Greiner y Konietzny, 2006).

Por lo contrario, en el caso de las fitasas intrínsecas de plantas, la mayoría tienden a tener un pH óptimo de 5.0. Además, las fitasas vegetales son lábiles al calor y su actividad se reduce o incluso se elimina en dietas granuladas (Jongbloed y Kemme, 1990); mientras que la mayor parte de las fitasas microbianas corresponden a enzimas que mantienen una actividad significativa incluso después de una exposición térmica prolongada (Pointillart, 1988).

En el Cuadro 1.5 se muestra una comparación de las diferentes fuentes de fitasas microbianas en base a su actividad catalítica, pH y temperatura óptima (Asgard y Shearer, 1997).

Cuadro 1.5 Comparación de diferentes fuentes de fitasas microbianas (Asgard y Shearer, 1997).			
Fuente de fitasa	Actividad de la fitasa (U mg⁻¹) (37°C)	pH óptimo	Temperatura óptima
Hongos			
<i>Aspergillus caespitosus</i>	ND	5.5	80
<i>Aspergillus fumigatus</i>	23 – 28	5.0 – 6.0	60
<i>Aspergillus niger</i>	50 – 103	5.0 – 5.5	55 – 58
<i>Aspergillus oryzae</i>	11	5.5	50
<i>Aspergillus terreus</i>	142 – 196	5.0 – 5.5	70
<i>Penicillium simplicissimum</i>	3	4.0	55
<i>Peniophora lycii</i>	1, 080	5.5	58
<i>Thermomyces lanyginosus</i>	110	6.0	65
Bacterias			
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	20	7.0 – 8.0	70
<i>Bacillus subtilis</i>	9.0 – 15	6.5 – 7.5	55 – 60
<i>Citrobacter braakii</i>	3, 457	4.0	50
<i>Escherichia coli</i>	811 – 1, 800	4.5	55 – 60
<i>Klebsiella terrigena</i>	205	5.0	58
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	ND	4.0	50
<i>Pantoea agglomerans</i>	23	4.5	60
<i>Pseudomonas syringae</i>	769	5.5	40
Levaduras			
<i>Candida krusei</i>	1, 210	4.6	40
<i>Pichia anomala</i>	ND	4.0	60

En el Cuadro 1.6 se resume la información comercial de diferentes empresas sobre las fitasas autorizadas. Según el reporte de investigación de mercado (Hou *et al.*, 2001), las fitasas producidas en Europa y América del Norte son más competitivas que las fitasas producidas por las empresas asiáticas. La razón es que las primeras tienen mayor actividad por unidad de enzima. Por lo general, la actividad de las fitasas en polvo procedentes de Europa y América del Norte puede alcanzar 40, 000 - 4, 000, 000 U g⁻¹. Su actividad fitasa lipídica está por arriba de 40, 000, 000 U ml⁻¹.

Cuadro 1.6 Información comercial sobre la producción de fitasas microbianas (Hou *et al.*, 2001).

Empresa	País	Fuente de fitasa	Cepa productora	Marca
AB Enzymes	Alemania	<i>Aspergillus awamori</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	Finase
Alko Biotechnology	Finlandia	<i>A. oryzae</i>	<i>A. oryzae</i>	SP, TP, SF
Alltech	EUA	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	Allzyme phytase
BASF	Alemania	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	Natuphos
BioZyme	EUA	<i>A. oryzae</i>	<i>A. oryzae</i>	AMAFERM
DSM	EUA	<i>P. Lycii</i>	<i>A. oryzae</i>	Bio-Feed Phytase
Fermie	México	<i>A. oryzae</i>	<i>A. oryzae</i>	Phyzyme
Finnfeeds International	Finlandia	<i>A. awamori</i>	<i>T. reesei</i>	Avizyme
Genencor International	EUA	<i>P. simplicissimum</i>	<i>Penicillium fumiculosum</i>	ROVABIO
Roal	Finlandia	<i>A. awamori</i>	<i>T. reesei</i>	Finase
Novozymes	Dinamarca	<i>A. oryzae</i>	<i>A. oryzae</i>	Ronozyme®

Además, estas fitasas tienen un rango de tolerancia de pH y temperatura más amplio que los de las empresas asiáticas (Zhan *et al.*, 2004). Por ejemplo, la enzima Natuphos producida por la compañía BASF puede mantener 75% de la actividad bajo una temperatura de 75 °C durante 15 minutos (Wang *et al.*, 2001). La fitasa Allzyme producida por la empresa Alltech puede mantener más del 60% de la actividad cuando el pH se encuentra por arriba de 6.5 o por debajo de 2.5.

Los precios del mercado de las fitasas de las antiguas empresas (aproximadamente \$12.5 - 15 dólares por kilogramo) también son más estables que aquellas enzimas de empresas recientes (Zhan *et al.*, 2004). En contraste, las fitasas de varias empresas

asiáticas son de nuevo desarrollo, como en China, Japón y Corea del Sur. Sus métodos de formulación son todavía inmaduros. La actividad fitasa es generalmente alrededor de 500 - 5, 000 U g⁻¹ o 5, 000 - 50, 000 U ml⁻¹ y los precios de estas fitasas fluctúan alrededor de \$ 3.10 dólares por kilogramo (Wang *et al.*, 2001).

1.8.2 Fitasa de *Selenomonas ruminantium*

Una fitasa que presenta características interesantes para ser expresada de forma heteróloga es la fitasa de *S. ruminantium*. Esta fitasa, como se mencionó anteriormente, pertenece a la clase de proteínas PTP, ya que contiene en su sitio activo la secuencia característica (HCX₅RS/T) de este tipo de enzimas y además su estructura y mecanismo de hidrólisis es similar a las PTP (Puhl *et al.*, 2007 Chu *et al.*, 2004).

Al ser caracterizada bioquímicamente, se observó que esta enzima tiene actividad en un rango de pH que va de 4.0 a 6.0, a una temperatura de 37 °C en la cepa silvestre de *S. ruminantium* (Cheng *et al.*, 1999). Su masa molecular es de aproximadamente 39 KDa y su punto isoeléctrico (pI) calculado es de 8.54.

Esta enzima ha sido sobreexpresada de manera recombinante en semillas de arroz, observándose actividad en un rango de pH que va de 3.0 a 5.5 con dos picos de actividad óptima en 3.0 y 5.0. La temperatura óptima en este caso fue de 60 °C (Hong *et al.*, 2004). Estas características la hacen muy atractiva para ser utilizada en aplicaciones industriales como la alimentación animal de los animales monogástricos, donde el pH del estómago se encuentra entre 2.0 y 3.0, en tanto que el pH del intestino delgado, se encuentra a un pH de entre 4.0 y 7.0 (Cheng *et al.*, 1999).

Aunque los parámetros de pH y temperatura mencionadas anteriormente la hacen atractiva para su uso en la alimentación animal, el rendimiento obtenido tan solo fue del 0.5 % de proteína soluble total (PST), el cual no cumple con el 1 % necesario para que una proteína recombinante sea viable para su comercialización (Kusnadi *et al.*, 1997) por lo que es importante analizar otros sistemas de expresión como es el caso de *Chlamydomonas reinhardtii* para tratar de alcanzar el porcentaje de proteína necesario para su comercialización.

1.9 *Chlamydomonas reinhardtii*

1.9.1 Características generales

Chlamydomonas reinhardtii es una microalga verde unicelular eucariota que pertenece a la división chlorophyta (Harris, 2001), grupo considerado como los predecesores de las plantas terrestres debido a su situación en la línea evolutiva. En el caso de las células del tipo silvestre de *C. reinhardtii* presentan un tamaño promedio de 10 μm de diámetro por 3 μm de ancho (con una variación significativa a través del ciclo celular), cubierta por una pared celular constituida principalmente de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (Figura 1.7A). Sin embargo, cabe mencionar que la pared celular de *C. reinhardtii* no contiene celulosa. El género *Chlamydomonas* está conformado por dos flagelos en su extremo anterior, los cuales están involucrados en el movimiento celular y reconocimiento sexual. Por otra parte, al interior de la célula se observa un único cloroplasto basal en forma de copa, el cual ocupa aproximadamente entre el 40% y 60% del volumen celular. Además, podemos encontrar una o varias estructuras denominadas pirenoides, las cuales se encargan de la fijación de dióxido de carbono (CO_2) y las reacciones independientes de la luz. Así mismo, en la periferia de la célula, se encuentra la mancha ocular, la cual es rica en carotenos y se cree que es la encargada de percibir y dirigir la luz hacia el fotoreceptor verdadero de la microalga. También existen otros compartimentos como son, la mitocondria, la cual está dispersa a través del citosol, el núcleo y el nucléolo que se localizan prominentes en la sección transversal de la célula, y una vacuola contráctil que se localiza en el extremo anterior de la célula, el cual lleva a cabo la regulación osmótica (Figura 1.7B) (Harris, 2001).

Actualmente, existen aproximadamente 459 especies diferentes de *Chlamydomonas* que pueden ser caracterizadas por su morfología común. Sin embargo, especies del género se han distinguido por las diferencias en tamaño y forma celular, forma y posición de los cloroplastos y pirenoides, longitud flagelar, el número y posición de las vacuolas contráctiles, y entre otras características estructurales visibles en el microscopio óptico.

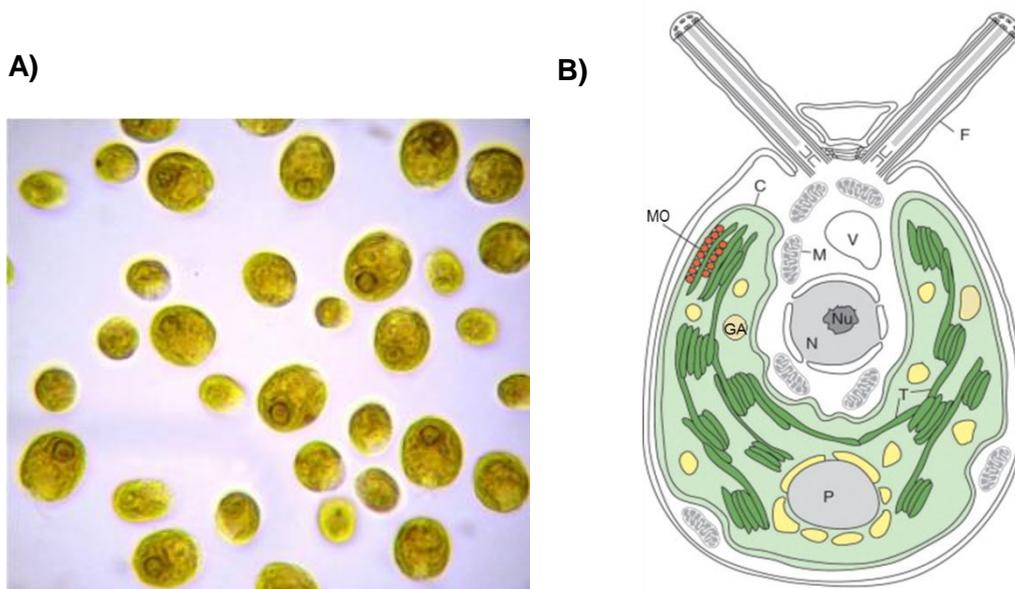


Figura 1.7 Representación morfológica de la célula de *C. reinhardtii*; **A)** Imagen de microscopio óptico (100X); **B)** Estructura interna (Dent *et al.* 2001). F, flagelo; V, vacuola; C, cloroplasto; MO, mancha ocular; M, mitocondria; Nu, nucleolo; N, núcleo; P, pirenoide; GA, granulo de almidón; T, tilacoide (Harris, 2001).

El genoma nuclear tiene un tamaño estimado de aproximadamente 1×10^8 pares de bases (Harris, 1989) y es rico en GC (aproximadamente un 62%). Este alto contenido de GC puede producir dificultades en la clonación de genes. Sin embargo, la amplificación se mejora mediante la selección de secuencias de oligonucleótidos con 45% a 50% de contenido de GC, y mediante la inclusión de 7-deaza-2'-5'-trifosfato de deoxiguanosina (c^7dGTP) en la mezcla de la reacción de PCR (Randolph-Anderson *et al.*, 1998). Por otra parte, el genoma mitocondrial lineal está constituido de 15.8 kb, el cual contiene sólo unos pocos genes, tales como: *cob*, *cox1*, cinco subunidades de NADH deshidrogenasa mitocondrial y ARNr mitocondrial. En cambio, el cloroplasto contiene su propio genoma circular de aproximadamente 200 kb, cabe destacar que cada cloroplasto contiene aproximadamente 80 copias idénticas del genoma (Goldschmidt-Clermont, 1991; Newman *et al.*, 1990), propiedad que le permite a *C. reinhardtii* ser un potencial sistema de expresión de proteínas recombinantes.

1.9.2 Aplicación de *C. reinhardtii* como modelo de estudio

Entre los organismos unicelulares fotosintéticamente activos, la microalga verde *C. reinhardtii* es ampliamente conocida como uno de los mejores sistemas disponibles en

la biotecnología para impulsar la investigación en la producción de biomasa, biocombustibles, productos endógenos de alto valor agregado como enzimas técnicas, o productos heterólogos como las proteínas recombinantes (Stephens *et al.*, 2010; Wobbe *et al.*, 2009; Beckmann *et al.*, 2009; Mayfield y Schultz, 2004). Como sistema modelo genético bien establecido, *C. reinhardtii* tiene como beneficios, un genoma completamente secuenciado (Merchant *et al.*, 2007), protocolos de transformación estandarizados, rutas metabólicas y requerimientos de cultivo bien conocidos.

Hasta la fecha, la gran mayoría de los estudios recientes emplean a *C. reinhardtii*, ya que es la mejor caracterizada entre las especies de microalgas. La transformación del genoma del cloroplasto de *C. reinhardtii* se logra por recombinación del sitio específico entre secuencias homologas de ADN presentes en el plastoma (Newman *et al.*, 1990). Como se mencionó anteriormente, el cloroplasto dispone de un genoma circular de aproximadamente 200 kb, y cada cloroplasto contiene aproximadamente 80 copias idénticas del genoma. Consecuentemente, para que la transformación del cloroplasto sea estable, se requiere que todas las 80 copias se encuentren en su forma recombinante. En contraste a la típica transformación nuclear, la transformación del plastidio es frecuentemente realizada por recombinación homóloga; por lo tanto, los eventos de integración pueden ser precisos para cualquier región del genoma del cloroplasto mientras que contenga un denominado "sitio silencioso" para la inserción del transgen (Newman *et al.*, 1990; Goldschmidt-Clermont, 1991).

Debido a que *C. reinhardtii* es clasificada como un organismo generalmente considerado como seguro (GRAS, Generally regarded as safe) (Harris, 2001) y hacen de ella un sistema atractivo para un uso comestible. Por ejemplo, Manuell y colaboradores (2007) reportaron que este organismo ofrece el potencial para la liberación oral de proteínas recombinantes activas en el intestino, tales como, M-SAA (*mammalian coding región of bovine mammary-associated serum amyloid*), el cual estimula la producción de mucina en el intestino, activando la profilaxis de infecciones bacterianas y virales. Por otra parte, Yoon y colaboradores (2011), usaron microalgas transgénicas como aditivos de alimentos para la liberación de enzimas dietéticas sin la necesidad de realizar una purificación proteica. Por consiguiente, estos resultados demuestran que *C. reinhardtii* puede ser utilizada como sistema de producción de proteínas recombinantes biológicamente activas para la industria tanto terapéutica como de alimentos.

1.9.3 Microalgas como sistemas biorreactores

Durante los últimos 40 años, los avances en la ingeniería genética y biotecnología han ampliado el alcance de la biomanufactura, permitiendo el uso de organismos genéticamente modificados para la producción de proteínas recombinantes. Los actuales hospederos para la expresión de proteínas recombinantes incluyen bacterias, levaduras, células de insectos, plantas, células de mamífero y animales transgénicos, y cada una de estas plataformas tiene ventajas específicas y sus limitaciones (Corchero *et al.*, 2013).

Las células microbianas tales como bacterias y levaduras son plataformas preferidas para la producción de enzimas industriales debido a que pueden producir proteínas recombinantes a un relativo bajo costo (Demain y Vaishnav 2009). La bacteria *Escherichia coli* ha sido el caballo de batalla para la producción de proteínas recombinantes, pero solo es adecuada para producir proteínas pequeñas y estructuralmente simples. Las bacterias generalmente no llevan a cabo modificaciones post-traduccionales tales como, la formación de enlaces disulfuro y glicosilación, y son ineficientes para el plegamiento y secreción de proteínas. Por lo tanto, las proteínas complejas pueden terminar como cuerpos de inclusión insolubles (Ferrer-Miralles *et al.*, 2009).

En cambio, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un sistema de expresión eucariótica capaz de realizar tanto el plegamiento de proteínas complejas como realizar modificaciones post-traduccionales, obteniendo alta producción y escalabilidad (Celik y Calik, 2012). Sin embargo, *S. cerevisiae* tiende a hiperglicosilar proteínas recombinantes, las cuales han mostrado ser inmunogénicas para el humano.

Por otra parte, las células de mamíferos tales como, las células de ovario de hámster chino, son actualmente la plataforma de expresión preferida para grandes proteínas terapéuticas complejas, y para aquellas que requieren modificaciones post-traduccionales (Zhu, 2012). Sin embargo, los niveles de expresión para algunas proteínas complejas pueden ser bastante bajos, y las líneas celulares suelen ser muy inestables. Por ello cabe mencionar que dicho sistema de expresión es de los más costosos (Corchero *et al.*, 2013).

Mientras que los actuales sistemas de expresión de proteínas recombinantes están en proceso, varios proyectos de investigación están en marcha para desarrollar plataformas alternas con el fin de minimizar las limitaciones antes mencionadas. Tal es el caso de las microalgas verdes, las cuales han tenido recientemente una considerable atención como sistema de producción de proteínas recombinantes para diversas aplicaciones industriales.

Las microalgas verdes presentan diversas ventajas y características deseables como sistema de expresión, tales como: ofrecer bajos costos de producción, obtener altos índices de crecimiento, tener una gran diversidad metabólica, y obtener un fácil escalamiento del cultivo. Además, por ser microorganismos fotosintéticos, su crecimiento celular se puede llevar a cabo en un biorreactor cerrado o al exterior en un estanque de 100 hectáreas. Por lo tanto, son mínimos los requerimientos necesarios para el medio de crecimiento, los cuales son: luz, CO₂, H₂O y nutrientes simples. Una de las ventajas de llevar a cabo el crecimiento celular en biorreactores, es la reducción en la pérdida del cultivo por depredación o ataque de patógenos, y a su vez, por una posible contaminación ambiental por flujo génico de cepas transgénicas.

Las ventajas que ofrece un crecimiento fotosintético son aún mayores. Primero, son reducidos los costos del medio de cultivo comparado con los sistemas de expresión de proteínas convencionales, tanto en términos de costos económicos como costos de energía. Segundo, la ausencia de una fuente de carbono reducida, disminuye los riesgos de contaminación por bacterias y hongos, simplificando los procesos de manufacturación y permitiendo una producción a escala agrícola. No obstante, varias microalgas pueden crecer heterotróficamente, es decir, con una fuente de carbono reducida en ausencia de luz. Por lo tanto, pueden ser utilizadas en fermentadores existentes con protocolos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration).

Seguridad es otra ventaja asociada con la producción de proteínas recombinantes utilizando las microalgas como sistema de expresión. Varias especies de algas verdes son generalmente consideradas como seguras (GRAS, Generally Regarding As Safe) para el consumo animal y humano, esto significa que si la proteína recombinante es expresada en una forma biodisponible, la etapa de purificación podría ser completamente descartada. Por consiguiente, esta ventaja hace de las algas verdes sistemas productores de proteínas recombinantes para diversas aplicaciones, como en

la industria alimenticia, la agricultura, y la cosmetología, donde una purificación nula o parcial de la proteína puede ser requerida. Esta simplificación durante el proceso y formulación de proteínas recombinantes permite una considerable reducción de los costos, ya que la etapa de purificación representa el 80% del total de costos de manufacturación para los sistemas convencionales (Walsh, 2010; DePalma, 2009).

Debido a que es una célula eucariota, otras de sus ventajas a destacar es su capacidad de realizar modificaciones post-transcripcionales y post-traduccionales, ya que posee las chaperonas y maquinaria celular requerida para plegar proteínas complejas, cosa que en otros sistemas como bacterias y levaduras no son capaces de realizar apropiadamente (Surzycki *et al.*, 2009; Franklin y Mayfield, 2004). Las microalgas también exhiben una eficiencia fotosintética superior, siendo aproximadamente tres veces más eficiente que el de las plantas superiores (Shimizu, 1996). Otra característica, la cual facilita el desarrollo de cepas de microalgas transgénicas, es la disponibilidad de métodos de transformación bien establecidos para genomas nucleares y cloroplásticos, los cuales requieren un tiempo relativamente corto entre la generación de los transformantes iniciales, y la evaluación de la expresión de proteínas (Franklin y Mayfield, 2004; Harris, 1989; Boynton *et al.*, 1988). Otros beneficios adicionales incluyen la capacidad de secretar proteínas y disponer de una amplia variedad de elementos promotores cloroplásticos y nucleares bien establecidos (Rochaix *et al.*, 2000; Rochaix, 1996).

Finalmente, las microalgas presentan una fácil escalabilidad, donde se pueden obtener altos índices de crecimiento a partir de una sola célula, alcanzado hasta 1, 000 litros en cuestión de semanas, comparado con el tiempo escala en cuestión de meses o años en las plantas superiores tales como tabaco o maíz (Franklin y Mayfield, 2004). Por lo tanto, las microalgas verdes al combinar su rápido crecimiento y fácil cultivo celular, lo cual son características inherentes para varios microorganismos con capacidad fotosintética, brindan una perspectiva económica y de seguridad de forma positiva. Esta serie de características y ventajas hacen de este sistema una atractiva propuesta para la expresión de proteínas recombinantes (Mayfield *et al.*, 2007; Mayfield y Franklin, 2005).

Por otra parte, los sistemas de eficiencia de transformación en microalgas son necesarios para mejorar su potencial como sistemas biorreactores. La viabilidad de las

microalgas para ser genéticamente modificadas, y a su vez, expresar genes exógenos, abre la posibilidad de mejorar la producción de compuestos endógenos de la microalga, además de la producción de nuevos productos bioactivos para su aplicación farmacéutica e industrial a través de la ingeniería metabólica.

1.9.4 *C. reinhardtii* como biorreactor para la producción de proteínas recombinantes.

Entre las microalgas, la más comúnmente utilizada es *C. reinhardtii*, ya que posee diversas ventajas en comparación con los sistemas convencionales para la producción de proteínas recombinantes. Tales ventajas son, los bajos costos de producción, su rápida escalabilidad en un cultivo homogéneo, no son susceptibles a infecciones virales o patógenos que son dañinos para el humano, presentan una maquinaria tanto eucariótica como procariótica que le permite plegar una variedad de proteínas complejas con precisión, tienen la capacidad de crecer tanto en condiciones fotoautotróficas como heterotróficas en presencia de una fuente de carbono como el acetato, y tiene un ciclo sexual rápido y controlable (alrededor de 2 semanas) con haploides estables y viables (Specht *et al.*, 2010). Entre las diversas especies de microalgas verdes, *C. reinhardtii* tiene como ventaja ser un organismo considerado como seguro. Por varios años, las microalgas verdes han sido reconocidas como una excelente fuente de nutrición, y han sido utilizadas como alimento o ingredientes en varios productos. Por ello, *C. reinhardtii* como microalga verde transgénica comestible, tiene el potencial para producir y liberar oralmente principios activos biológicos para la salud, y nutrición humana y animal, sin el requerimiento de etapas de purificación. (Walsh, 2010).

Recientemente varias proteínas están oralmente disponibles, al igual que bioactivos que actúan en el intestino incluyendo proteínas colostrales. Tal es el caso de Manuelli y colaboradores en el 2007, quienes demostraron la expresión del amiloide A sérico asociada a mamíferos (MAA) en el cloroplasto de *C. reinhardtii*, reportando una acumulación de proteína por arriba del 5% del total de proteína soluble. La proteína algal MAA, la cual actúa como profilaxis para prevenir infecciones bacterianas patógenas, es capaz de estimular la secreción de mucina en las células epiteliales del intestino de humanos para bloquear la adhesión bacteriana.

Actualmente en la mayoría los estudios se ha empleado a *C. reinhardtii* como organismo modelo por ser la especie de microalga mejor caracterizada, puesto que los

tres genomas que posee (cloroplástico, nuclear y mitocondrial) han sido completamente secuenciados, proporcionando una amplia información y una base sólida para una manipulación específica. Así mismo, se disponen de protocolos de transformación y vectores para cada uno de estos genomas (Popescu y Lee, 2007; Merchant *et al.*, 2007; Maul *et al.*, 2002).

Recientemente se ha reportado la expresión de diversas proteínas recombinantes en *C. reinhardtii*, tanto en el genoma nuclear como cloroplástico, demostrando su potencial uso como sistema de expresión (Rosales *et al.* 2012). No obstante existen ventajas y limitaciones para las proteínas expresadas a partir de cada genoma (Cuadro 1.7).

Cuadro 1.7 Comparación del genoma nuclear y cloroplástico para la producción de proteínas recombinantes (Rosales *et al.* 2012).

	Genoma nuclear	Genoma cloroplástico
Método de transformación	Electroporación, biobalística, agitación con perlas de vidrio	Biobalística
Integración genética	No es homóloga (al azar)	Recombinación homóloga
Niveles de acumulación de proteínas	Bajos: tan alto como 0.25% del total de proteína soluble	Altos: 1 – 21% del total de proteínas soluble
Modificación post-traduccionales	Formación de puentes disulfuro, fosforilación, glicosilación	Formación de puentes disulfuro y fosforilación
Localización de proteínas	Las proteínas pueden ser dirigidas a varios sitios: citoplasma, núcleo, cloroplasto, retículo endoplásmico, mitocondria, secreción	Las proteínas permanecen en el cloroplasto
Maquinaria de expresión genética	Eucariótica	Procariótica
Expresión genética inducible	Nutriente, químico, fisiológico	Inducible por luz
Silenciamiento de genes	Probable	No es probable

La transformación del genoma nuclear generalmente ocurre por inserción al azar a través de una unión de extremos no homólogos (Mayfield y Kindle, 1990; Kindle *et al.*, 1989). La ingeniería del genoma nuclear ofrece todas las ventajas asociadas con los sistemas de expresión eucariótica, tales como permitir la expresión de transgenes inducibles, proporcionar un eficiente plegamiento de proteínas complejas, permitir la

secreción de proteínas recombinantes, y realizar modificaciones post-traduccionales tales como formación de puentes disulfuro, fosforilación y glicosilación. Además, *C. reinhardtii* es un organismo haploide con un ciclo sexual bien establecido (Harris *et al.*, 2009). Por lo tanto, la ingeniería de cepas y optimización de estrategias de apareamiento son fáciles, rápidos y sencillos. Sin embargo, unas de las limitaciones en la ingeniería del genoma nuclear es la baja acumulación de la proteína recombinante.

Los mecanismos moleculares sobre la baja expresión del transgen en el genoma nuclear aun no son elucidados, posibles razones incluyen: el silenciamiento del transgen, promotores débiles, y efectos de posición durante la integración del gen heterólogo en el genoma (Wu-Scharf, 2000; Cerutti *et al.*, 1997). Debido a que la transformación nuclear ocurre principalmente por inserción al azar, esto frecuentemente conlleva a los “efectos de posición”, en el cual los niveles de expresión del transgen está influenciado por las regiones genómicas que lo rodean (Rasala *et al.*, 2012). La limitación más significativa para la ingeniería del genoma nuclear en *C. reinhardtii*, es que los genes nucleares recombinantes con frecuencia exhiben un comportamiento de silenciamiento, tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional, por lo que es difícil alterar el sistema al emplear estrategias de sobreexpresión establecidas (Cerutti *et al.*, 1997).

Como se mencionó anteriormente, *C. reinhardtii* contiene un único cloroplasto que ocupa aproximadamente entre el 40 y 60% del volumen total de la célula. Dicho cloroplasto contiene su propio genoma denominado plastoma, el cual es una molécula circular de aproximadamente 200 Kb, y cada cloroplasto contiene aproximadamente 80 copias idénticas del genoma. Consecuentemente, la transformación estable del cloroplasto requiere que todas las 80 copias del genoma se encuentren en la forma recombinante. A diferencia de la transformación nuclear, la transformación cloroplástica ocurre frecuentemente a través de la integración por recombinación homóloga; por lo tanto, los eventos de inserción pueden ser dirigidos a cualquier región en el genoma del cloroplasto, los cuales contienen los llamados “sitios silencio” para la integración del gen heterólogo (Newman *et al.* 1990; Golshmidt-Clermont 1991). De igual forma, se ha observado que el cloroplasto presenta el fenómeno de corrección de copias, de esta forma la integración del gen heterólogo en el genoma del cloroplasto, será más sencilla si el gen está flanqueado por secuencias homólogas con las ya existentes en dicho organelo. La transformación de las células se logra con la

integración del gen heterólogo en solo algunas copias del genoma cloroplástico, obteniéndose células con un genoma transplastómico homólogo después de 10 a 20 divisiones celulares bajo un medio de selección. La expresión de proteínas recombinantes en el genoma del cloroplasto, es característica por su expresión estable y por los altos niveles de acumulación de proteína, típicamente de 1 a 10% del total de proteína (Gong *et al.*, 2011), hasta niveles tan altos como el 21% reportado por Surzycki y colaboradores en el 2009.

Por otra parte, se ha reportado que las microalgas verdes surgieron después de un evento de endosimbiosis primaria, en el cual una cianobacteria fotosintética formó parte del interior de un ancestro eucariótico dando lugar a lo que ahora es el plastidio. Por consiguiente, el cloroplasto de la microalga verde contiene una maquinaria de expresión genética de origen procariótico, incluyendo ribosomas y factores de traducción (Manuell *et al.*, 2007; Baligni *et al.*, 2004). Sin embargo, a diferencia de las bacterias, el cloroplasto contiene una amplia gama de chaperonas (Schroda, 2004), proteínas disulfuro isomerasas (Danon y Mayfield, 1994), y peptidilprolil isomerasas (PPIasas) (Breiman *et al.*, 1992) que participan con el plegamiento de proteínas complejas del aparato fotosintético. No obstante, mientras que las proteínas recombinantes son expresadas en el genoma del cloroplasto, éstas pueden ser modificadas mediante la formación de enlaces disulfuro, pero no pueden ser glicosiladas.

En la Figura 1.8 se ilustra la estructura básica de *C. reinhardtii*, así como las localizaciones celulares de la acumulación de proteína recombinante, dependiendo de la construcción del gen y el método de transformación. En el caso de la transformación del plastoma, la acumulación del producto transgénico ocurre en el cloroplasto. En cambio, los productos de los genes nucleares se acumulan en el citosol por defecto; sin embargo, si se realiza una transformación nuclear con secuencias señal apropiadas, se permitirá un direccionamiento de la proteína al retículo endoplásmico, seguido del aparato de Golgi para su exportación (Griesbeck *et al.*, 2006) o para su ubicación en la membrana celular, lo cual puede ser suficiente para el reconocimiento antigénico en el caso de una vacuna oral (Eichler-Stahlberg *et al.* 2009).

El genoma del cloroplasto puede ser transformado a través de recombinación homóloga utilizando el método de biobalística, el cual consiste en el bombardeo de células con partículas de oro o tungsteno recubiertas con ADN (Koop *et al.*, 2007). En

cambio, la transformación nuclear en microalgas también puede lograrse por el método de biobalística; no obstante los métodos preferentes son por electroporación o agitación con perlas de vidrio utilizando cepas de pared celular defectuosa (Eichler-Stanhlberg *et al.*, 2009; Leon y Fernández, 2007).

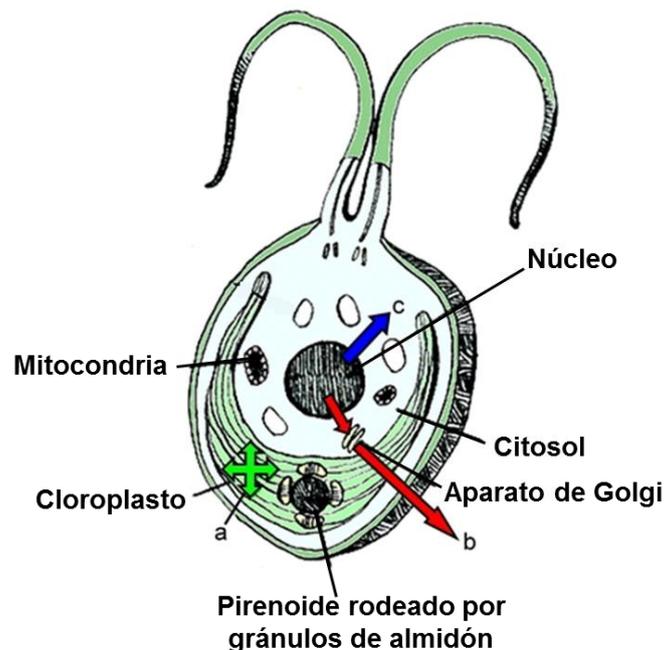


Figura 1.8 *C. reinhardtii* como sistema versátil para la producción de proteínas recombinantes; a) La proteína expresada a partir del genoma del cloroplasto se acumula al interior de dicho organelo. El ambiente reducido del cloroplasto permite un correcto plegamiento de las proteínas que presentan enlaces disulfuro, lo cual no se logra fácilmente en sistemas convencionales como las bacterias; b) La proteína expresada a partir del genoma nuclear se acumula en el citosol, al menos que está presente una secuencia señal de exportación. En este caso, la proteína es dirigida al retículo endoplásmico para su translocación y procesamiento; c) y posteriormente, es dirigida al aparato de Golgi para su empaquetamiento y exportación al medio extracelular (Specht *et al.*, 2010).

1.9.5 Sistemas de expresión para la producción de proteínas recombinantes en *C. reinhardtii*

Uno de los principales objetivos de la ingeniería genética es la producción de un alto rendimiento de proteínas recombinantes. Para ello, el diseñar una construcción de expresión se espera optimizar todas las etapas de la expresión del gen, desde la transcripción hasta la estabilidad de la proteína. Por lo tanto, la construcción de

expresión, el cual está conformado por el transgen y debe incluir varios elementos regulatorios que son conocidos por ser óptimos en la actividad de *C. reinhardtii*. Dichos elementos son el promotor y las regiones no traducibles (UTRs) 5´/3´ del ARNm.

Los promotores *PsbD*, *RbcS2* y *HSp70A* han sido ampliamente utilizados para dirigir la expresión nuclear de genes en *C. reinhardtii* y estos son considerados actualmente los mejores promotores constitutivos disponibles (Schroda, 2006; Fisher y Rochaix, 2001; Kindle, 1998). En cambio, en el cloroplasto de *C. reinhardtii*, los promotores *rbcl*, *atpA*, *psbD* y *psbA*, junto con sus respectivos UTRs, son recientemente la mejor elección para obtener altos niveles del transcrito (Surzycki *et al.* 2009; Manuell *et al.* 2007).

Trabajos previos han identificado regiones en el 5´UTR que pueden dar dramáticamente un impacto sobre la estabilidad del ARNm, y potencialmente ser utilizado como un medio para aumentar la síntesis de proteínas recombinantes (Suay *et al.* 2005; Salvador *et al.* 2004). Esto se logra probablemente a través de la interacción de los UTRs endógenos y las regiones codificantes, dando como resultado estructuras secundarias que mejoran la eficiencia de traducción por interacciones con factores de proteínas que actúan en trans (Franklin y Mayfield, 2004; Eberhard *et al.*, 2002; Vaistij *et al.*, 2000). En el Cuadro 1.9 se muestran los diferentes promotores cloroplásticos empleados para la expresión de proteínas recombinantes.

Algunos estudios han revelado que la eficiencia de traducción es una etapa limitante para la expresión de genes del cloroplasto. No obstante, se ha mostrado que los 5´UTRs de los ARNm del plastidio, contienen los elementos clave para la regulación de la traducción (Nickelsen, 2003; Ederhard *et al.*, 2002; Gallie, 1998; Wells *et al.*, 1998). En el 2005, Barnes y colaboradores evaluaron el efecto de varios UTRs endógenos sobre la expresión de proteínas en el cloroplasto de *C. reinhardtii*, en el cual se utilizaron los promotores y 5´UTR de cinco genes del cloroplasto de *C. reinhardtii* (*atpA*, *rbcl*, *psbA*, *psbD* y *16S ARNr*) fusionado con el gen reportero *gfp* (optimizado por el codón) seguido por el 3´UTR, ya sea de los genes *atpA*, *rbcl*, *psbA* o *ARNt_{arg}*; de estos, se obtuvieron una serie de genes quiméricos, los cuales fueron integrados en el genoma del cloroplasto. Ellos observaron que la acumulación de la proteína fue generalmente proporcional a la acumulación de ARNm, obteniendo los niveles más altos de proteína recombinante utilizando ambos promotores, *atpA* o *psbD*, junto con el 5´UTR. Una muy baja acumulación de proteína se observó bajo el control del *rbcl* y *psbA*, incluso no se detectó ninguna expresión utilizando el *16S*

ARNr 5'UTR.

Cuadro 1.8 Promotores del cloroplasto de *C. reinhardtii* usados para la expresión de proteínas heterólogas.

Promotor	Fuente génica	Niveles de expresión más altos (%TPS)	Construcción (prom-gen-3'UTR)	Cepa	Ref.
<i>atpA</i>	Subunidad alfa de adenosina trifosfatasa	~ 3 - 4	<i>atpA-CTBVP1-rbcL</i> ^a	137c (mt+)	Sun <i>et al.</i> , (2003)
<i>psbD</i>	Fotosistema II D1	~ 0.25	<i>psbD-M-SAA-psbA</i> ^b	137c (mt+)	Manuell <i>et al.</i> , (2007)
<i>rbcL</i>	Subunidad grande Ribulosa bifosfato carboxilasa	~ 0.7	<i>rbcL-CTBD2-rbcL</i> ^c	125c (mt+)	Dreesen <i>et al.</i> , (2010)
<i>psbA</i>	Fotosistema II <i>psbA</i>	~ 3.0	<i>psbA-14FN3-psbA</i> ^d	137c (mt+)	Rasala <i>et al.</i> , (2010)

a Proteína de fusión que comprende la proteína VP1 del virus de la enfermedad pie y boca y la subunidad B de la toxina del cólera (CTBVP1)

b Amiloide sérico asociado a mama (M-SAA)

c Proteína de fusión que comprende el dominio de la fibronectina D2 de unión de *Staphylococcus aureus* y la subunidad B de la toxina del cólera (CTBD2)

d Dominio 14 de la fibronectina de humano (14FN3)

Por otra parte, Rasala y colaboradores en el 2010 reportaron que los promotores cloroplásticos *psbA* y *atpA* participaron en la expresión de tres proteínas recombinantes, que incluyen 14FN3, VEGF y HMGB1. Interesantemente, al emplear el promotor *psbA* junto con el UTR correspondiente, se obtuvo un aumento sobre la acumulación de proteína 20 veces mayor en comparación a aquellos niveles alcanzados por la construcción comprendida por el promotor *atpA* y su correspondiente 5' UTR. A partir de estos datos, se considera que la traducción y la acumulación de ARNm están determinadas principalmente por el promotor y el 5'UTR; por lo tanto, la selección del promotor y la región reguladora son factores críticos a considerar para lograr obtener un alto rendimiento de cada proteína de interés.

La acumulación de la proteína recombinante depende no solo de la tasa de transcripción de su gen codificante, que es determinada principalmente por el promotor y la secuencia UTR utilizada, sino también sobre el estado estacionario del ARNm y la estabilidad de la proteína. La expresión de genes en sistemas heterólogos ha demostrado la importancia de la alteración del uso del codón con el fin de aumentar

las tasas de expresión de la proteína y por consiguiente su producción. Los transgenes de especies heterólogos tienen con frecuencia un uso del codón diferente a la de la célula hospedero, lo que podría dar lugar a una interrupción en los codones desfavorecidos, truncamiento, incorrecta incorporación o un cambio en el marco de lectura (Campbell y Growri, 1990).

Como en otros sistemas de expresión, la optimización del codón ha jugado un papel importante en la exitosa expresión de proteínas recombinantes tanto en el genoma nuclear como cloroplástico de *C. reinhardtii* (Heitzer *et al.*, 2007). El uso del codón del genoma nuclear y cloroplástico son altamente divergentes, en el cual el cloroplasto tiene preferencia por nucleótidos de adenina (A) o timina (T) en la tercera posición del codón, mientras que el núcleo tiene preferencia por nucleótidos de guanina (G) o citocina (C) (Nakamura *et al.*, 2000). Diversas investigaciones han confirmado el impacto de alterar la composición del codón de un transgen para obtener un aumento sobre la acumulación de proteína recombinante en el cloroplasto de *C. reinhardtii*. Esto es demostrado por Franklin y colaboradores en el 2002, donde obtuvieron genes de la proteína verde fluorescente (*gfp*) optimizado por el codón y genes *gfp* no optimizados. Ambos genes fueron regulados por el promotor *rbcL* y su correspondiente 5'ÚTR, y fueron integrados al genoma del cloroplasto obteniendo una elevada acumulación de la proteína recombinante. La cuantificación de la acumulación de *gfp* del gen optimizado por el codón, mostró un aumento en la acumulación de 80 veces mayor comparado con la versión no optimizada. Por lo tanto, la optimización del codón es un paso efectivo y necesario en la optimización de la secuencia del gen heterólogo de interés.

Como conclusión, existen tres componentes esenciales para una estable transformación del cloroplasto por recombinación homóloga: primero, una construcción de expresión conteniendo tanto promotores como UTRs 5'/3' endógenos; segundo, la optimización del codón tanto para el gen de la proteína recombinantes como para el marcador de selección; y finalmente, un sitio de integración en el cual un gen recombinante pueda ser insertado sin interrumpir la función del cloroplasto.

1.9.6 Transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii*

Los cloroplastos son organelos especializados de plantas y organismos fotosintéticos donde se lleva a cabo la fotosíntesis, pero también se albergan otras vías biosintéticas importantes. La transformación del plastidio puede involucrar la liberación de ADN

dentro del cloroplasto o de plastidios no verdes. Una vez que se ha logrado una transformación estable, todos los tipos de plastidios en la planta u organismo fotosintético contendrán el mismo plastoma (genoma del plastidio) transgénico. Es importante mencionar que debido a que existe una variedad de formas de desarrollo del plastidio, el término transformación del plastidio es más preciso que transformación del cloroplasto. No obstante, en esta sección se hará mención a este último por ser el término empleado en el presente estudio.

La transformación del cloroplasto es una herramienta importante para la investigación de diversos aspectos fisiológicos y de regulación de expresión de genes en plantas y organismos fotosintéticos. Este método también ha ganado un fuerte interés para su potencial aplicación en la Biotecnología por presentar diversas ventajas comparado con la transformación en el genoma nuclear (Meyers *et al.*, 2010). Lo más destacado es que la expresión transgénica en el cloroplasto puede ser significativamente alta y la proteína recombinante deseada puede representar hasta el 70% de la proteína soluble total (Daniell *et al.*, 2009; Oey *et al.*, 2009; Ruhlman *et al.*, 2000). También es importante destacar, que a diferencia del genoma nuclear donde la integración del transgen ocurre frecuentemente al azar, la integración en el genoma del plastidio ocurre por recombinación homóloga permitiendo una inserción dirigida y precisa del transgen. Por lo tanto, son evitados los efectos de posición variable sobre la expresión del gen o la inactivación inadvertida de un gen hospedero por la integración del gen heterólogo. Esto explica por qué la acumulación de proteínas recombinantes puede alcanzar niveles mayores en el cloroplasto, en comparación con las expresadas en el genoma nuclear. Así mismo, en el cloroplasto no ocurren mecanismos de silenciamiento de genes u otros mecanismos que puedan reducir la producción de proteínas recombinantes a partir de genes codificados en el núcleo (Bock, 2007), permitiendo una integración estable de genes recombinantes dentro del plastoma que pueden permanecer activos por largos periodos de tiempo (Georgianna *et al.* 2013). El cloroplasto puede ser transformado a través de múltiples genes en un solo evento, debido a la disponibilidad de múltiples sitios de inserción en el genoma, y por la capacidad de procesar transcritos policistrónicos, los cuales pueden ser regulados en una construcción de expresión génica completa a través de un solo promotor (Bock, 2007; Rymarquis *et al.* 2006).

Por otra parte, las proteínas recombinantes producidas en el cloroplasto no son glicosiladas debido a su maquinaria de origen procariótico (Franklin y Mayfield, 2005),

por lo que pueden resultar útiles en diversas aplicaciones, tales como la producción de anticuerpos que son capaces de reconocer al antígeno, pero aquellos que carecen de glicosilación para evitar ser reconocidos por células del sistema inmunológico (Tran *et al.* 2009).

La transformación del plastidio se ha logrado en un gran número de plantas superiores; sin embargo, actualmente solo se ha logrado con éxito en la microalga verde *C. reinhardtii*, en la alga roja *Porphyridium sp.* (Lapidot *et al.*, 2002) y en *Euglena gracillis* (Doetsch *et al.*, 2001). Entre las microalgas, fue a partir de *C. reinhardtii* que se logró la primera transformación del cloroplasto (Boynton *et al.*, 1988) y se desarrolló el marcador de selección *aadA* (Goldschmidt-Clermont, 1991). Solo en *C. reinhardtii* se ha reportado una significativa acumulación de proteínas recombinantes a través de la transformación del cloroplasto (Yoon *et al.*, 2011; Rasala *et al.*, 2010) debido a que presenta un gran número de sitios de integración que han sido identificados en el plastoma, en el cual los efectos de delección no ocurren cuando el ADN heterólogo es integrado.

Para la producción de proteínas recombinantes en plantas superiores, se utilizan promotores y UTRs endógenos y exógenos. Sin embargo, en *C. reinhardtii* se utilizan principalmente promotores y UTRs endógenos, debido a que se ha reportado poco éxito en el uso de elementos similares de otras especies para la expresión de genes recombinantes en el núcleo o cloroplasto (Walker *et al.*, 2005).

Actualmente se disponen de dos técnicas que han dado lugar a la obtención de transformantes cloroplásticos estables, que son el método por biobalística y por agitación con perlas de vidrio (*glass beads*).

Debido al alto grado de poliploidía del genoma del cloroplasto de *C. reinhardtii*, implica que después de la integración inicial del ADN de interés en una copia del plastoma, el cloroplasto transformado tiene que ser amplificado y segregado para producir células homoplásmicas, donde todas las copias del genoma son transformadas (Figura 1.9). Esto es típicamente logrado por varias rondas de propagación o subclonación de los transformantes bajo condiciones selectivas (Day y Goldschmidt, 2011).

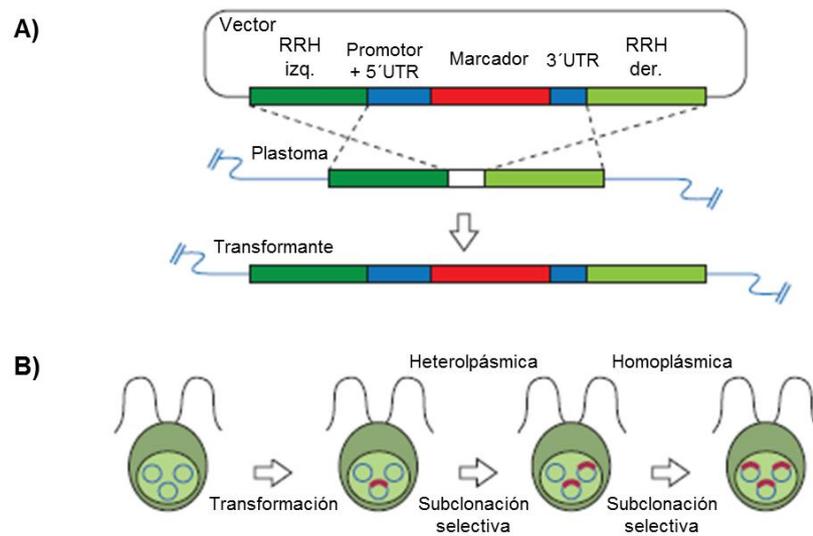


Figura 1.9 Transformación del cloroplasto; **A)** en el vector de transformación, un marcador de selección (rojo) se coloca bajo el control de señales de expresión del plastidio (promotor, 5'UTR, 3'UTR) (se muestran en azul). La recombinación homóloga a través de las regiones flanqueantes, que son la región de recombinación izquierda (RRH izq.) y la región de recombinación homóloga derecha (RRH der.), dirigen la integración del marcador en el genoma del plastidio. El transformante resultante lleva una inserción del marcador, o una sustitución de la secuencia diana entre las dos regiones de recombinación (barra blanca); **B)** La integración inicial en una sola copia del plastoma poliploide es heteroplásmica. En *Chlamydomonas*, los cloroplastos individuales contienen aproximadamente cientos de copias de su genoma. Varias rondas de subclonación y selección permiten la recuperación de clones homoplásmicos. Esto es sólo posible si ninguna función esencial del plastoma ha sido interrumpida por la inserción, de lo contrario, se mantiene un estado heteroplásmico donde se conservan las copias de tipo silvestre y la secuencia de interés, con el fin de lograr un balance de selección a través del marcador y la función esencial de la célula (Day y Goldschmidt, 2011).

Hasta la fecha solo se conoce un reporte donde se indique el uso del cloroplasto de *C. reinhardtii* como biorreactor para la producción de una fitasa. Tal es el caso del estudio de Yoon y colaboradores (2011) quienes proporcionaron la primera evidencia de la expresión funcional de una fitasa microbiana del gen *appA* de *E. coli*, y demostraron el concepto del uso de microalgas transgénicas como aditivo alimenticio para la entrega de enzimas dietéticas sin necesidad de la purificación de proteínas. Para ello, realizaron un proceso de lisis a una pasta celular por congelación en nitrógeno líquido, seguido de su liofilización. Este preparado liofilizado lo denominaron como "clasato", y

fue dosificada directamente a un grupo de pollos experimentales, y se comprobó que fue capaz de realizar su actividad enzimática a niveles similares que el de la fitasa fúngica comercial utilizada como control. No obstante, los rendimientos obtenidos en este trabajo fueron muy bajos, aproximadamente de 10 U mg^{-1} de lisado celular, que aun suponiendo que tengan el 100% de actividad catalítica, sería muy baja en comparación con la actividad de la misma enzima purificada a partir de *E. coli*. Los extractos purificados pueden llegar a tener una actividad entre los 811 a 1800 U mg^{-1} (Yoon et al., 2011). Este bajo rendimiento fue atribuido a la ausencia del péptido señal, y estos autores consideran que esto pudiera haber generado inestabilidad en el ARNm y por lo tanto, afectó en la traducción de la proteína.

Basándonos en esta última aproximación, previamente en el laboratorio se generó un plásmido (*pChPhy*) que permitió la transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii* para su uso como biorreactor en la producción recombinante de una fitasa (Rivera-Solís et al., 2013) (Figura 1.10). Dicho plásmido posee la región de recombinación homóloga de $\sim 3.5 \text{ Kb}$ (RRH1), una construcción de expresión que comprende a la región P+5'UTR del gen *rbcL* del cloroplasto de *C. reinhardtii*, el gen *aadA* que codifica para el gen de resistencia estreptomicina adenil transferasa y la región 3'UTR del gen *rbcL* del cloroplasto de *C. reinhardtii*. Así mismo, contiene una construcción de expresión que está constituida por la secuencia del gen *phyASr* que se encuentra fusionado con la región del P+5'UTR del *atpA* y la región 3'UTR del *psbA*, junto con la secuencia de la región de recombinación homóloga de $\sim 2.0 \text{ Kb}$ (RRH2). El gen *phyASr* codifica para la fitasa de la bacteria del rumen *S. ruminantium*, la cual fue seleccionada por presentar propiedades atractivas como aditivo alimenticio debido a su alta actividad específica (400 U mg^{-1} cuando ha sido expresada en *E. coli*), amplio rango de pH al cual se encuentra activa (3.0 a 6.0) y resistencia a la actividad de proteasas (Cheng et al., 1999). Así mismo, a diferencia de los animales monogástricos, las fitasas a partir de microorganismos del rumen de animales poligástricos tienen una alta actividad usando fitato como sustrato (Raun et al., 1956).

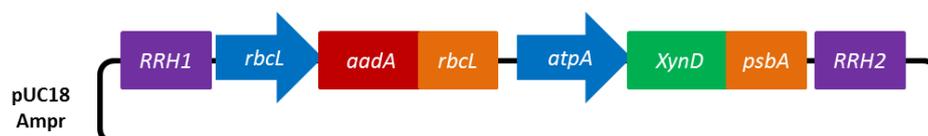


Figura 1.10 Plásmido *pChPhy* para la transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii* (Rivera-Solís et al., 2013).

Posteriormente, en el laboratorio se llevó a cabo la transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii* con el plásmido *pChPhy* por el método de biobalística, en el cual se obtuvieron líneas transgénicas que fueron sometidas a múltiples rondas de propagación bajo condiciones selectivas para la producción de células homoplásmicas (Bernardo-Candeleró, datos no publicados). Las líneas transformadas fueron analizadas para determinar la inserción del gen *phyASr* mediante la técnica de Southern blot. En este experimento se observó un patrón que indica que las líneas de *C. reinhardtii* contienen el gen de la fitasa en el genoma del cloroplasto, es decir las líneas son transplastómicas. En este caso la digestión generó un fragmento de alrededor de 6.0 kb en donde se unió a la sonda *phy*, que fue diseñada para un fragmento de la secuencia del gen *phyASr*.

Por otra parte, fue necesario realizar otro Southern blot para verificar la homoplásmia (es decir que todas las copias del genoma del cloroplasto presenten el gen de la fitasa) de las líneas transplastómicas, pero ahora con una sonda diferente; en este caso fue una sonda diseñada en la región de recombinación homologa del plásmido (sonda RH1), misma que se debe unir a la región de recombinación homóloga de la cepa silvestre. En los resultados de este experimento se generó una banda de aproximadamente 6.5 kb para las clonas homoplásmicas, mientras que el tamaño de la banda es diferente para la línea silvestre de *C. reinhardtii*, cuyo peso es aproximadamente de 9 kb. Si las líneas fueran heteroplásmicas presentarían ambos patrones de banda. En este caso, todas las clonas analizadas de cada línea presentaron el patrón de homoplasmia, comprobando que todas las copias del genoma del cloroplasto fueron transformadas. De todas las líneas analizadas se eligieron cinco de ellas para posteriores experimentos, las cuales fueron: 13-1, 21-1, 25-2, 29-7 y B3-3. Estas líneas transplastómicas fueron las utilizadas para realizar los análisis de la presente tesis.

1.10 JUSTIFICACIÓN

La presencia de factores anti-nutricionales en el alimento, como el IP₆, ha influido negativamente en la digestión y absorción de nutrientes por parte de los animales monogástricos, lo que ha ocasionado, un aumento en los costos de producción animal y un impacto negativo al ambiente. Por esta razón, se ha considerado implementar estrategias para enfrentar la deficiencia de digestión y el problema de contaminación por el exceso de P. Para ello, se propone el uso de enzimas exógenas como aditivos alimenticios, con el fin de aumentar la disponibilidad de los nutrientes para su digestión y reducir el impacto negativo de éstos sobre el ambiente. Así mismo, permite ofrecer grandes beneficios tanto al productor como al consumidor de los productos ganaderos.

Por lo tanto, se considera de gran importancia la producción de la enzima fitasa, la cual está encargada de la desfosforilación del IP₆, dando como resultado a un aumento en la asimilación del P de la dieta. Es por ello que en el laboratorio de Biotecnología de Microalgas del CICY se han investigado fuentes de fitasas menos costosas a las utilizadas actualmente, por lo que previamente se han generado líneas transplastómicas de la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, las cuales presentan el gen *phyASr* que codifica para una fitasa de la bacteria anaerobia del rumen, *Selenomonas ruminantium*. En el presente trabajo se pretende caracterizar dichas líneas para verificar la expresión de este gen mediante RT-PCR de punto final y RT-PCR de tiempo real. Además, determinar el efecto de la adición del extracto liofilizado de una de estas líneas transplastómicas sobre el crecimiento de la línea silvestre de *C. reinhardtii* en un medio libre de P pero adicionado con IP₆.

1.11 HIPÓTESIS

Si las líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* contienen al gen *phyASr* fusionado al promotor *atpA* y terminador *psbA*, entonces debe ser posible evaluar la expresión del *phyASr*, y la fitasa producida permitirá un mejor aprovechamiento del fitato del medio y por tanto, un mayor crecimiento de esta microalga.

1.12 OBJETIVOS

1.12.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión del gen *phyASr* en líneas transplastómicas de *C. reinhardtii*, y evaluar el efecto de un extracto liofilizado de una línea transplastómica sobre el crecimiento de la microalga en presencia de IP₆.

1.12.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- a) Evaluar la expresión del ARN mensajero del gen *phyASr* en líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* mediante RT-PCR de punto final y qRT-PCR.

- b) Evaluar el efecto del extracto liofilizado de una línea transplastómica, sobre el crecimiento de la línea silvestre de *C. reinhardtii* en un medio suplementado con IP₆ como única fuente de P.

1.13 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

- 1 RESIEMBRA DE LAS LÍNEAS TRANSPLASTÓMICAS DE *C. reinhardtii*
- 2 COLECTA Y CUANTIFICACIÓN CELULAR DE LOS CULTIVOS DE *C. reinhardtii*
- 3 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ARN DE LAS LÍNEAS TRANSPLASTÓMICAS DE *C. reinhardtii*
- 4 SÍNTESIS DE ADNc DE LAS LÍNEAS TRANSPLASTÓMICAS DE *C. reinhardtii*
- 5 ANÁLISIS DE LA CALIDAD DEL ADNc MEDIANTE RT-PCR DE PUNTO FINAL DE LAS LÍNEAS TRANSPLASTÓMICAS DE *C. reinhardtii*
- 6 EFICIENCIA DE AMPLIFICACIÓN DE LOS PRIMERS *rpl16* Y *phyASr* POR RT-PCR DE TIEMPO REAL
- 7 CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LA EXPRESIÓN DEL GEN HETERÓLOGO *phyASr* DE LAS LÍNEAS TRANSPLASTÓMICAS DE *C. reinhardtii*
- 8 COMPARACIÓN DE CRECIMIENTO DE LAS LÍNEAS TRANSPLASTÓMICAS Y LÍNEA SILVESTRE DE *C. reinhardtii* EN DIFERENTES MEDIOS CON FÓSFORO
- 9 EFECTO DEL EXTRACTO LIOFILIZADO DE UNA LÍNEA TRANSPLASTÓMICA SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA LÍNEA SILVESTRE DE *C. reinhardtii*

La metodología y resultados correspondientes a las secciones del 1 al 7 se reportan en el capítulo II (recuadros en azul), mientras que las secciones 8 y 9 se reportan en el capítulo III (recuadros en rojo).

1.14 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adeola, O., B.V. Lawrence, A.L. Sutton y T.R. Cline (1995). Phytase-induced changes in mineral utilization in zinc-supplemented diets for pigs. *Journal of Animal Science*. 73, 3384 – 3391.
- Alvarado, Y., L. Morales, L. Muñoz y S. Aké (2005). Oferta, demanda, balanza comercial y competitividad del pescado de México en el mundo. *Economic Analysis Working Papers*. 8(8), 1 – 28.
- Amerah, A.M., P.W. Plumstead, L.P. Barnard y A. Kumar (2014). Effect of calcium level and phytase addition on ileal phytate degradation and amino acid digestibility of broilers fed corn-based diets. *Poultry Science*. 93, 906 – 915.
- Angel, R., N.M. Tamim, T.J. Applegate, A.S. Dhandu y L.E. Ellestad (2002). Phytic acid chemistry: influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy. *The Journal of Applied Poultry Research*. 11, 471 – 480.
- Asgard, T. y K.D. Shearer (1997). The dietary phosphorus requirement of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) and its relationship to the phosphorus requirements reported for other fishes. *Aquaculture Nutrition*. 3, 17 – 23.
- Atteh, J.O. y S. Leeson (1984). Effects of dietary saturated or unsaturated fatty acids and calcium levels on performance and mineral metabolism in broilers. *Poultry Science*. 63, 2252 – 2260.
- Augspurger, N.R., D.M. Webel, X.G. Lei y D.H. Baker (2003). Efficacy of an *E. coli* phytase expressed in yeast for releasing phytate-bound phosphorus in young chicks and pigs. *Journal of Animal Science*. 81, 474 – 483.
- Badenhuizen, N.P. (1959). *Chemistry and Biology of the Starch Granule*. Springer, Vienna. 1 – 74 p.
- Baldi, B.G., J.J. Scott, J.D. Everard y F.A. Loewus (1988). Localization of constitutive hytases in lily pollen and properties of the pH 8 form. *Plant Science*. 56, 137 – 147.
- Barnes, D., S. Franklin, J. Schultz, et al. (2005). Contribution of 5'- and 3'-untranslated regions of plastid mRNAs to the expression of *Chlamydomonas reinhardtii*
-

- chloroplast genes. *Molecular Genetics and Genomics*. 274, 625 – 636.
- Barrientos, L.G. y P.P.N. Murthy (1996). Conformational studies of *myo*-inositol phosphates. *Carbohydrate Research*. 296, 39 – 54.
- Baruah K., A.K. Pal, N.P. Sahu, K.K. Jain, S.C. Mukherjee y D. Debnath (2005). Dietary protein level, microbial phytase, citric acid and their interactions on bone mineralization of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles. *Aquaculture Research*. 36(8), 803 – 812.
- Beckmann, J., F. Lehr, G. Finazzi, B. Hankamer, C. Posten y L. Wobbe (2009). Improvement of light to biomass conversion by de-regulation of light-harvesting protein translation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biotechnology*. 142, 70 – 77.
- Bedford, M.R. y Partridge G.G. (2010). *Enzymes in farm animal nutrition*. MPG Books Group, Bodmin, UK. 1 – 6 p.
- Beligni, M.V., K. Yamaguchi y S.P. Mayfield (2004). The translational apparatus of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Photosynthesis Research*. 82, 315 – 325.
- Bleukx, W. y F. Ruyseveldt (2008). Technical and economical considerations for feed phosphates. Internal report Tessenderlo Group-BG Chemicals.
- Bock, R. (2007). Plastid biotechnology: prospects for herbicide and insect resistance, metabolic engineering and molecular farming. *Current Opinion in Biotechnology*. 18, 100 – 106.
- Boynton, J.E., N.W. Gillham, E.H. Harris, J.P. Hosler, A.M. Johnson, A.R. Jones, B. Randolph-Anderson, D. Robertson, T.M. Klein, K.B. Shark y J.C. Sanford (1988). Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science*. 240, 1534 – 1538.
- Breiman, A., T.W. Fawcett, M.L. Ghirardi y A.K. Mattoo (1992). Plant organelles contain distinct peptidylprolyl cis, trans-isomerases. *The Journal of Biological Chemistry*. 267(30), 21293 – 21296.
- Cain K.D. y D.L. Garling (1995). Pretreatment of soybean meal with phytase for salmonid diets to reduce phosphorus concentrations in hatchery effluents.
-

- Progressive Fish-Culturist Journal. 57, 114 – 9.
- Campbell, W.H. y G. Gowri (1990). Codon usage in higher plants, green algae and cyanobacteria. *Plant Physiology*. 92, 1 – 11.
- Cao L., W. Wang, C. Yang, Y. Yang, J. Diana, A. Yakupitiyage, Z. Luoa y D. Li (2007). Application of microbial phytase in fish feed. *Enzyme and Microbial Technology*. 40, 497 – 507.
- Celik. E. y P. Calik (2012). Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances*. 30(5), 1108 – 1118.
- Cerutti, H., M.M. Johnson, N.W. Gilham y J.E. Boynton (1997). Epigenetic silencing of a foreign gene in nuclear transformants of *Chlamydomonas*. *Plant Cell*. 9, 1 – 22.
- Cheryan, M. (1980). Phytic acid interactions in food systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 13, 297 – 335.
- Chu H.M., R.T. Guo, T.W. Lin, C.C. Chou, H.L. Shr y H.L. Lai (2004). Structures of *Selenomonas ruminantium* phytase in omplex with persulfated phytate: DSP phytase fold and mechanism for sequential substrate hydrolysis. *Structure*. 12, 2015 – 2024.
- Comercio Exterior (2012) Competitividad de la producción porcina de México y Estados Unidos [Online] (Actualizado marzo 2012). Disponible en: http://revistas.bancomext.gob.mx/rce/magazines/139/7/RCE_MZO-ABR_2012_Competitividad.pdf [Acceso julio 2015].
- Corchero, J.L., B. Gasser, D. Resina, W. Smith, E. Parrilli, F. Vázquez, I. Abasolo, M. Giuliani, J. Jäntti, P. Ferrer, M. Saloheimo, D. Mattanovich, S. Schwartzr, M.L. Tutino y A. Villaverde (2013). Unconventional microbial systems for the cost-efficient production of high-quality protein therapeutics. *Biotechnol Advances*. 31(2),140 – 153.
- Corporación Nacional de Avicultores del Ecuador (2008) COBB La Evolución en el Consumo de Carne de Pollo [Online] (Actualizado enero 2015). Disponible en: <https://avicultura2015.com/cobb-la-evolucion-en-el-consumo-de-carne-de-pollo/> [Acceso mayo 2015].
-

- Cosgrove, D.J. (1966). The chemistry and biochemistry of inositol polyphosphates. *Reviews of Pure and Applied Chemistry*. 16, 209 – 24.
- Cosgrove, D.J. y G.C.J. Irving (1980). *Inositol Phosphates: Their Chemistry, Biochemistry and Physiology*. Elsevier Scientific Publication, Amsterdam.
- Cheng, C. y B.L. Lim (2006). Beta-propeller phytases in the aquatic environment. *Archives of Microbiology*. 185, 1 – 13.
- Cheng, K.J., B. L. Selinger, L. J. Yanke., H. D. Bae, L. Zhou y C. W. Forsberg, (1999). Phytases of ruminal microorganisms. US Patent Number: 5, 939, 303.
- Chu, H.-M., R.T. Guo, T.W. Lin, C.C. Chou, H.L. Shr, H.L. Lai, T.Y. Tang, K.J. Cheng, B.L. Selinger y A.H.J. Wang (2004). Structures of *Selenomonas ruminantium* phytase in complex with persulfated phytate: DSP phytase fold and mechanism for sequential substrate hydrolysis. *Structure*. 12(11), 2015-2024.
- Daniell, H., N.D. Singh, H. Mason y S.J. Streatfield (2009). Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trends in Plant Science*. 14, 669 – 679.
- Danon, A. y S.P. Mayfield (1994). Light-regulated translation of chloroplast messenger RNAs through redox potential. *Science*. 266, 1717 – 1719.
- Day, A. y M. Goldschmidt-Clermont (2011). The chloroplast transformation toolbox: selectable markers and marker removal. *Plant Biotechnology Journal*. 9, 540 – 553.
- Debnath, D., N.P. Sahu, A.K. Pal, K. Baruah, S. Yengkokpam y S.C. Mukherjee (2005). Review: Present scenario and future prospects of phytase in aquafeed. *Asian–Australian Journal of Animal Science*. 18, 1800 – 1812.
- Demain, A.L. y P. Vaishnav (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*. 27, 297 – 306.
- Dent, R.M., Han M. y Niyogi K.K. (2001). Functional genomics of plant photosynthesis in the fast lane using *Chlamydomonas reinhardtii*. *Trends in plant science*. 6(8), 364 – 371.
- DePalma, A. (2009). Strengthening mammalian cell culture. *Genetic Engineering & Biotechnology News*, 28(8).
-

- Dionisio, G., P.B. Holm y H. Brinch-Pedersen (2007). Wheat (*Triticum aestivum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) multiple inositol polyphosphate phosphatases (MINPPs) are phytases expressed during grain filling and germination. *Plant Biotechnology Journal*. 5, 325 – 338.
- Doetsch, N.A., M.R. Favreau, N. Kuscuoglu, M.D. Thompson y R.B. Hallick (2001). Chloroplast transformation in *Euglena gracilis*: splicing of a group III twintron transcribed from a transgenic *psbK* operon. *Current Genetics*. 39, 49 – 60.
- Dreesen, I.A.J., G. Charpin-El Hamri y M. Fussenegger (2010). Heat-stable oral alga-based vaccine protects mice from *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of Biotechnology*. 145, 273 – 280.
- Eastwood, M. (2003). Phosphorus, in: *Principles of Human Nutrition*, Eastwood, M. (ed). Blackwell Science. Oxford. pp. 311 – 353.
- Eberhard, S., D. Drapier y F.A. Wollman (2002). Searching limiting steps in the expression of chloroplast-encoded proteins: Relations between gene copy number, transcription, transcript abundance and translation rate in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Journal*. 31, 149 – 160.
- Eeckhout, W. y M. de Paepe (1991). The quantitative effects of an industrial microbial phytase and wheat phytase on the apparent phosphorus absorbability of a mixed feed by piglets. *Medical Faculty Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent*. 56, 1643 – 1647.
- Eeckhout, W. y M. de Paepe (1994). Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology*. 47, 19 – 29.
- Eichler-Stahlberg, A., W. Weisheit, O. Ruecker, et al. (2009). Strategies to facilitate transgene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*. 229, 873 – 883.
- Erdman, J.W. (1979). Oilseed phytates – nutritional implications. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 56, 736 – 741.
- Esteve-García, E., A.M. Perez-Vendrell y J. Broz (2005). Phosphorus equivalence of a consensus phytase produced by *Hansenula polymorpha* in diets for young turkeys. *Archives of Animal Nutrition*. 59, 53 – 59.
-

- Ferrer-Miralles, N., J. Domingo-Espin, J.L. Corchero, E. Vazquez y A. Villaverde (2009). Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories*. 8, 17.
- Fischer, N. y J.D. Rochaix (2001). The flanking regions of *PsaD* drive efficient gene expression in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Genetics and Genomics*. 265, 888 – 894.
- Franklin, S., B. Ngo, E. Efuet, et al. (2002). Development of a GFP reporter gene for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Plant Journal*. 30, 733 – 744.
- Franklin, S.E. y S.P. Mayfield (2004). Prospects for molecular farming in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current Opinion in Plant Biology*. 7, 159 – 165.
- Franklin, S.E. y S.P. Mayfield (2005). Recent developments in the production of human therapeutic proteins in eukaryotic algae. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 5, 225 – 235.
- Franklin, S.E. y S.P. Mayfield (2005). Recent developments in the production of human therapeutic proteins in eukaryotic algae. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 5, 225 – 235.
- Freedonia (2009). *World Enzymes to 2013*. Freedonia, Cleveland, Ohio, 70 p.
- Gallie, D.R. (1998). A tale of two termini: a functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation. *Gene*, 216, 1 – 11.
- Georgianna, D.R., M.J. Hannon, M. Marcushi, et al. (2013). Production of recombinant enzymes in the marine algae *Dunaliella tertiolecta*. *Algal research*. 2, 2 – 9.
- Goldschmidt-Clermont, M. (1991). Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker for site-directed transformation of *Chlamydomonas*. *Nucleic Acids Research*. 19(15), 4083 – 4089.
- Gong, Y., H. Hu, Y. Gao, X. Xu y H. Gao (2011). Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: progress and prospects. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 38, 1879 – 1890.

- Greiner R. y U. Konietzny (2006). Phytase for food application. *Food Technology and Biotechnology*. 44(2), 125 – 40.
- Greiner, R. (2006). Phytate-degrading enzymes: regulation of synthesis in microorganisms and plants, in: *Inositol Phosphates: Linking Agriculture and Environment*, Turner, B.L., A.E. Richardson y E.J. Mullaney (eds). CAB International. Wallingford. pp. 78 – 96.
- Griesbeck, C., I. Kobl y M. Heitzer (2006). *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Biotechnology*. 34, 213 – 223.
- Haefner, S., A. Knietsch, E. Scholten, J. Braun, M. Lohscheidt y O. Zelder (2005). Biotechnological production and applications of phytases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 68, 588 – 597.
- Haraldsson, A.K., L. Rimsten, M.L. Alminger, R. Andersson, T. Andlid, P. Aman y A.S. Sandberg (2004). Phytate content is reduced and β -glucanase activity suppressed in malted barley steeped with lactic acid at high temperature. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84, 653 – 662.
- Harland, B.F. y D. Oberleas (1999). Phytic acid complex in feed ingredients, in: *Phytase in animal nutrition and waste management*, Coelho, M.B. y Kornegay E.T. (eds). BASF. México. pp. 69 – 76.
- Harris, E. (1989). *The Chlamydomonas sourcebook*. Academic New York.
- Harris, E. (2001). *Chlamydomonas* as a model organism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 52(1), 363 – 406.
- Heitzer, M. y B. Zschoernig (2007). Construction of modular tandem expression vectors for the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* using the Cre/lox-system. *Biotechniques*. 43, 324 – 328.
- Hendriks, W.H. y P.J. Moughan (1993). Whole-body mineral composition of entire male and female pigs depositing protein at maximal rates. *Livestock Production Science*. 33, 161 – 170.
- Hill, R. y C. Tyler (1954). The influence of time, temperature, pH and calcium carbonate on the activity of the phytase of certain cereals. *Journal of Agricultural Science*.
-

44, 306 – 310.

Honke, J., A.S. Sandberg y H. Kozłowska (1999). The influence of pH and temperature on endogenous phytase activity and on hydrolysis of inositol hexaphosphate in lentil, faba bean and pea seeds. *Journal of Food and Nutrition Sciences*. 49, 109 – 122.

Hong, C.-Y., K.J. Cheng, T.H. Tseng, C.S. Wang, L.F. Liu y S.M. Yu (2004). Production of two highly active bacterial phytases with broad pH optima in germinated transgenic rice seeds. *Transgenic Research*. 13(1), 29-39.

Hou, B.Y. (2001). Advance in enzyme utilization in feed industry. *Animal Science/Veterinary Medicine*. 8(3), 4 – 5.

Humer, E., C. Schwarz y K. Schedle (2014). Review: Phytate in pig and poultry nutrition. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 1 – 21 p.

International Egg Commission (2015). The World Egg Industry - a few facts and figures [Online] (Actualizado enero 2015). Disponible en: <https://www.internationalegg.com/corporate/eggindustry/details.asp?id=18> [Acceso julio 2015].

Iqbal, T.H., K.O. Lewis y B.T. Cooper (1994). Phytase activity in the human and rat small intestine. *Gut*. 35, 1233 – 1236.

IUPAC-IUB (1989). Numbering of atoms in *myo*-inositol: recommendations 1988. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry. *Biochemistry Journal*. 258, 1 – 2.

IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1978). Nomenclature of phosphorus-containing compounds of biochemical importance. *Biochemical Journal*. 171, 1 – 19.

Jongbloed, A.W. y P.A. Kemme (1990). Effect of pelleting mixed feeds on phytase activity and the apparent absorbability of phosphorus and calcium in pigs. *Animal Feed Science and Technology*. 28, 233 – 242.

Jongbloed, A.W., Z. Mroz y P.A. Kemme (1992). The effect of supplementary *Aspergillus niger* phytase in diets for pigs on concentration and apparent digestibility of dry matter, total phosphorus, and phytic acid in different sections

- of the alimentary tract. *Journal of Animal Science*. 70, 1159 – 1168.
- Kemme, P.A., A. Lommen, L.H. DeJonge, J.D. Van der Klis, A.W. Jongbloed, Z. Mroz y A.C. Beynen (1999). Quantification of inositol phosphates using ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy in animal nutrition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47, 5116 – 5121.
- Kemme, P.A., U. Schlemmer, Z. Mroz y A.W. Jongbloed (2006). Monitoring the stepwise phytate degradation in the upper gastrointestinal tract of pigs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86, 612 – 622.
- Kim, Y.O., H.K. Kim, K.S. Bae, J.H. Yu y T.K. Oh (1998). Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. *Enzyme and Microbial Technology*. 22, 2 – 7.
- Kindle, K.L. (1990). High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87, 1228 – 1232.
- Kindle, K.L. (1998). Nuclear transformation: technology and applications, in: *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*, Rochaix, J.D., M. Goldschmidt-Clermont y S. Merchant S (eds). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. pp. 41 – 61-
- Knuckles, B.E. y A.A. Betschart (1987). Effect of phytate and other *myo*-inositol phosphate esters on α -amylase digestion of starch. *Journal of Food Science*. 52, 719 – 721.
- Konietzny, U. y R. Greiner (2002). Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *International Journal of Food Science and Technology*. 37, 791 – 812.
- Koop, H.U., S. Herz y T. Golds (2007). The genetic transformation of plastids, in: *Topics in current genetics, vol 19: cell and molecular biology of plastids*, Bock Ralph (ed). Berlin/Heidelberg. Springer. pp. 457 – 510.
- Kusnadi, A. R., Z. L. Nikolov y J. A. Howard (1997). Production of recombinant proteins in transgenic plants: Practical considerations. *Biotechnology and Bioengineering*. 56(5), 473 - 484.
- Lapidot, M., D. Raveh, A. Sivan, S.M. Arad y M. Shapira (2002). Stable chloroplast
-

- transformation of the unicellular red alga *Porphyridium* species. *Plant Physiology*. 129, 7 – 12.
- Lee, I.C. (2014). Section 12: Poultry Nutrition and Feeding, in: *Animal Nutrition Handbook*, Lee, I.C. (ed). Copyright. Auburn. pp. 411.
- Leeson, S. (1993). Recent advances in fat utilization by poultry, in: *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia*, Leeson, S. (ed). University of New England. Armidale, Australia. pp. 170 – 181.
- Leon, R. y E. Fernández (2007). Nuclear transformation of eukaryotic microalgae—historical overview, achievements and problems, in: *Transgenic microalgae as green cell factories*, Leon, R., E. Fernandez (eds). Landes Bioscience and Springer Science Business Media LLC. New York. pp. 1 – 11.
- Létourneau-Montimy, M.P., A. Narcy, P. Lescoat, M. Magnin, J.F. Bernier, D. Sauvant, C. Jondreville y R. Pomar (2011). Modelling the fate of dietary phosphorus in the digestive tract of growing pigs. *Journal of Animal Science*. 89, 3596 – 3611.
- Li M.H. y E.H. Robinson (1997). Microbial phytase can replace inorganic phosphorus supplements in channel catfish *Ictalurus punctatus* diets. *Journal World Aquaculture Society*. 28, 402 – 6.
- Li, S., X. Yang, S. Yang, M. Zhu y X. Wang (2012). Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2(3), 234 – 237.
- Li, Y.D., A. Awati, H. Schulze y G. Partridge (2014). A critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 95, 878 – 896.
- Liebert, F., C. Wecke y F.J. Schoner (1993). Phytase activities in different gut contents of chickens as dependent on levels of phosphorus and phytase supplementations, in: *Proceedings of the 1st Symposium on Enzymes in Animal Nutrition*, Wenk, C. y M. Boessinger (eds). Switzerland. pp. 202 – 205.
- Lillford, P.J. y D.J. Wright (1981). Influence of isoelectric precipitation on the solubility of soya bean proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 32, 315 – 327.
-

- Lindqvist, Y., G. Schneider y P. Vihko (1994). Crystal structures of rat acid phosphatase complexed with the transition-state analogs vanadate and molybdate. Implications for the reaction mechanism. *European Journal of Biochemistry*. 221, 129 – 142.
- Lon-Wo (2003). La producción avícola y la contaminación ambiental. VIII Encuentro de Nutrición y Producción de Animales Monogástricos.
- Loppes, R. y R. E. Matagne (1973). Acid phosphatase mutants in *Chlamydomonas*: isolation and characterization by biochemical, electrophoretic and genetic analysis. *Genetics*. 75(4), 593-604.
- Luttrell, B. M. (1993). The biological relevance of the binding of calcium ions by inositol phosphates. *The Journal of Biological Chemistry*. 268, 1521 – 1524.
- Maenz, D.D. (2001). Enzymatic and other characteristics of phytases as they relate to their use in animal feeds, in: *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. Bedford, M.R. Partridge, G.G. (ed). CABI Wallingford, UK, 61 – 84 p.
- Mahan, D.C. y R.G. Shields (1998). Macro and micro mineral composition of pigs from birth to 145 kilograms of body weight. *Journal of Animal Science*. 76, 506 – 512.
- Manuell, A.L., M.V. Beligni y J.H. Elder (2007). Robust expression of a bioactive mammalian protein in *Chlamydomonas chloroplast*. *Plant Biotechnology Journal*. 5, 402 – 412.
- Matagne, R.F., R. Loppes y R. Deltour (1976). Phosphatase of *Chlamydomonas reinhardtii*: biochemical and cytochemical approach with specific mutants. *Journal of Bacteriology*. 126(2), 937 – 950.
- Maul, J.E., J.W. Lilly, L. Cui, C.W. dePamphilis, W. Mille, E.H. Harris y D.B. Stern (2002). The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: Islands of genes in a sea of repeats. *Plant Cell*. 14, 2659 – 2679.
- Mayfield, S.P. y K.L. Kindle (1990). Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by using a *C. reinhardtii* gene as the selectable marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87, 2087 – 2091.
- Mayfield, S. y J. Schultz (2009). Development of a luciferase reporter gene, luxCt, for

- Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. The Plant Journal. 37, 449 – 458.
- Mayfield, S.P. y S.E. Franklin (2005). Expression of human antibodies in eukaryotic micro-algae. Vaccine. 23, 1828 – 1832.
- Mayfield, S.P., A.L. Manuell, S. Chen, J. Wu, M. Tran, D. Siefker, M. Muto y J. Marin-Navarro (2007). *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories. Current Opinion in Biotechnology. 18, 126 – 133.
- Merchant, S.S., S.E. Prochnik, O. Vallon, E.H. Harris, S.J. Karpowicz, G.B. Witman, A. Terry, A. Salamov, L.K. Fritz-Laylin, L. Maréchal-Drouard, W.F. Marshall, L.H. Qu, D.R. Nelson, A.A. Sanderfoot, M.H. Spalding, V.V. Kapitonov, Q. Ren, P. Ferris, E. Lindquist, H. Shapiro, S.M. Lucas, J. Grimwood, J. Schmutz, P. Cardol, H. Cerutti, G. Chanfreau, C.L. Chen, V. Cognat, M.T. Croft, R. Dent, S. Dutcher, E. Fernández, H. Fukuzawa, D. González-Ballester, D. González-Halphen, A. Hallmann, M. Hanikenne, M. Hippler, W. Inwood, K. Jabbari, M. Kalanon, R. Kuras, P.A. Lefebvre, S.D. Lemaire, A.V. Lobanov, M. Lohr, A. Manuell, I. Meier, L. Mets, M. Mittag, T. Mittelmeier, J.V. Moroney, J. Moseley, C. Napoli, A.M. Nedelcu, K. Niyogi, S.V. Novoselov, I.T. Paulsen, G. Pazour, S. Purton, J.P. Ral, D. M. Riaño-Pachón, W. Riekhof, L. Rymarquis, M. Schroda, D. Stern, J. Umen, R. Willows, N. Wilson, S.L. Zimmer, J. Allmer, J. Balk, K. Bisova, C.J. Chen, M. Elias, K. Gendler, C. Hauser, M.R. Lamb, H. Ledford, J.C. Long, J. Minagawa, M.D. Page, J. Pan, W. Pootakham, S. Roje, A. Rose, E. Stahlberg, A.M. Terauchi, P. Yang, S. Ball, C. Bowler, C.L. Dieckmann, V.N. Gladyshev, P. Green, R. Jorgensen, S. Mayfield, B. Mueller-Roeber, S. Rajamani, R.T. Sayre, P. Brokstein, I. Dubchak, D. Goodstein, L. Hornick, Y.W. Huang, J. Jhaveri, Y. Luo, D. Martínez, W.C.A. Ngau, B. Otilar, A. Poliakov, A. Porter, L. Szajkowski, G. Werner, K. Zhou, I.V. Grigoriev, D.S. Rokhsar y A.R. Grossman (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. Science. 318(5848), 245 – 250.
- Meyers, B., A. Zaltsman, B. Lacroix, S.V. Kozlovsky y A. Krichevsky (2010). Nuclear and plastid genetic engineering of plants: comparison of opportunities and challenges. Biotechnology Advances. 28, 747 – 756.
- Morris, E.R. (1986). Phytate and dietary mineral bioavailability, in: Phytic Acid Chemistry and Applications, Graf, E. (ed). Pilatus Press. Minneapolis. pp. 57.
-

- Mullaney, E.J. y A.H.J. Ullah (2003). The term phytase comprises several different classes of enzymes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 312, 179 – 184.
- Nakamura, Y., H. Fukuhara y K. Sano (2000). Secreted phytase activities of yeasts. *Bioscience of Biotechnology and Biochemistry*. 64, 841 – 844.
- Nelson, T.S., T.R. Shieh, R.J. Wodzinski y J.R. Ware (1971). Effect of supplemental phytase on utilization of phytate phosphorus by chicks. *The Journal of Nutrition*. 101, 1289 – 1293.
- Newman, S.M., J.E. Boynton, N.W. Gillham, B.L. Randolph-Anderson, A.M. Johnson y E.H. Harris (1990). Transformation of chloroplast ribosomal RNA genes in *Chlamydomonas*: molecular and genetic characterization of integration events. *Genetics*. 126(4), 875 – 888.
- Nickelsen, J., M. Fleischmann, E. Boudreau, M. Rahire y J.D. Rochaix (1999). Identification of cis-acting RNA leader elements required for chloroplast *psbD* gene expression in *Chlamydomonas*. *Plant Cell*. 11, 957 – 970.
- O'Dell, B.L. y R.A. Sunde (1997). Introduction, in: *Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements*, O'Dell, B.L. y R.A. Sunde (eds). Marcel Dekker. New York. pp. 1 – 12.
- Oey, M., M. Lohse, B. Kreikemeyer y R. Bock (2009). Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic. *Plant Journal*. 57, 436 – 445.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) (2014) *Cerdos y la producción animal* [Online] (Actualizado noviembre 2014). Disponible en: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/pigs/production.html> [Acceso: mayo 2015].
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (2014) *Examen mundial de la pesca y la acuicultura* [Online] (Actualizado mayo 2014) Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i3720s/i3720s01.pdf> [Acceso julio 2015].
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO)
-

(2012) Visión general del sector acuícola nacional [Online] (Actualizado marzo 2012) Disponible en: http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_mexico/es [Acceso julio 2015].

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (2000) Integración por Zonas de la Ganadería y de la Agricultura Especializadas (AWI) [Online] (Actualizado enero 2000). Disponible en: <http://www.fao.org/wairdocs/lead/X6372S/x6372s02.htm> [Acceso julio 2015].

Pallauf, J. y G. Rimbach (1997). Nutritional significance of phytic acid and phytase. *Archives of Animal Nutrition*. 50, 301 – 319.

Patni, N.J., S.W. Dhawale y S. Aaronson (1977). Extracellular phosphatases of *Chlamydomonas reinhardi* and their regulation. *Journal of Bacteriology*. 130(1), 205-211.

Peers, F.G. (1953). The phytase of wheat. *Biochemical Journal*. 53, 102 – 110.

Pointillart A. (1988). *Phytate phosphorus utilisation in growing pigs*. Digestive physiology in the pig. Jablonna, Poland. 192 – 196 p.

Pons, T., R. Gomez, G. China y A. Valencia (2003). Beta-propellers: associated functions and the role human diseases. *Current Medicinal Chemistry*. 10, 505 – 524.

Popescu, C.E. y R.W. Lee (2007). Mitochondrial genome sequence evolution in *Chlamydomonas*. *Genetics*. 175(2), 819 – 826.

Porvari, K.S., A.M. Herrala, R.M. Kurkela, P.A. Taavitsainen, Y. Lindqvist y G. Schneider (1994). Site-directed mutagenesis of prostatic acid phosphatase. Catalytically important aspartic acid 258, substrate specificity, and oligomerization. *Journal of Biological Chemistry*. 269, 22642 – 22646.

PR Newswire (2014) Global Swine Feed Market - Trends and Forecasts (2014-2020) [Online] (Actualizado agosto 2014). Disponible en: <http://www.prnewswire.com/news-releases/global-swine-feed-market---trends-and-forecasts-2014-2020-271783931.html> [Acceso julio 2015].

PR Newswire (2010) Reportlinker Adds Global Industrial Enzymes Market: An Analysis [Online] (Actualizado 18 Noviembre 2010) Disponible en:

<http://www.prnewswire.com/news-releases/reportlinker-adds-global-industrial-enzymes-market-analysis108979419.html><http://www.biopharma.com/approvals.html> [Acceso Diciembre 2015]

- Puhl, A.A., R.J. Gruninger, R. Greiner, T.W. Janzen, S.C. Mosimann y L.B. Selinger (2007). Kinetic and structural analysis of a bacterial protein tyrosine phosphatase-like myo-inositol polyphosphatase. *Protein Science*. 16(7), 1368 – 1378.
- Pulz, O. y W. Gross (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 65(6), 635 – 648.
- Randolph-Anderson, B.L., R. Sato, A.M. Johnson, E.H. Harris, C.R. Hauser, K. Oeda, F. Ishige, S. Nishio, N.W. Gillham y J.E. Boynton (1998). Isolation and characterization of a mutant protoporphyrinogen oxidase gene conferring herbicide resistance from a nuclear genomic library of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant of Molecular Biology*. 38, 839 – 858.
- Rasala, B.A., A.P. Lee, Z. Shen, S.P. Briggs, M. Mendez y S.P. Mayfield (2012). Robust Expression and Secretion of Xylanase1 in *Chlamydomonas reinhardtii* by Fusion to a Selection Gene and Processing with the FMDV 2A Peptide. *Plos one*. 7(8), 1 – 11.
- Rasala, B.A., M. Muto y P.A. Lee, et al. (2010). Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnology Journal*. 8, 1 – 15.
- Rasmussen, S.K., K.S. Johansen y M.B. Sørensen (2007). Polynucleotides encoding phytase polypeptides. US Patent 7186817.
- Reddy, N.R., M.D. Pierson y S.K. Sathe (1989). Interactions of phytate with proteins and minerals, in: *Phytates in Cereals and Legumes*, Reddy, N.R. (ed). CRC Press. Florida. pp. 57.
- Rickard, S.E. y L.U. Thompson (1997). Interactions and biological effects of phytic acid, in: *Antinutrients and Phytochemicals in Food*, Shahidi, F. (ed). American Chemical Society. Washington, DC. pp. 294 – 312.

- Rivera-Solís, R.A., Peraza S., Echeverría I. y Herrera V. (2013). *Chlamydomonas reinhardtii* has a small family of purple acid phosphatase homologue genes that are differentially expressed in response to phytase. *Annals of Microbiology*. 64(2), 551 – 559.
- Rochaix, J.D. (1996). Post-transcriptional regulation of chloroplast gene expression in *Chlamydomonas*. *Plant Molecular Biology*. 32, 327 – 341.
- Rochaix, J.D., N. Fischer y M. Hippler (2000). Chloroplast site-directed mutagenesis of photosystem I in *Chlamydomonas*: electron transfer reactions and light sensitivity. *Biochimie*. 82, 635 – 646.
- Rodehutsord, M. (2001). Current phosphorus evaluation systems for livestock in Germany. *Lohmann-Information*. 25, 1 – 8.
- Rosales-Mendoza, S., L.M.T. Paz-Maldonado y R.E. Soria-Guerra (2012). *Chlamydomonas reinhardtii* as a viable platform for the production of recombinant proteins: current status and perspectives. *Plant Cell Reports*. 4, 479 – 494.
- Ruhlman, T., D. Verma, N. Samson y H. Daniell (2010). The role of heterologous chloroplast sequence elements in transgene integration and expression. *Plant Physiology*. 152, 2088 – 2104.
- Rutherford, S.M., T.K. Chung y P.J. Moughan (2014). Effect of microbial phytase on phytate P degradation and apparent digestibility of total P and Ca throughout the gastrointestinal tract of the growing pig. *Journal of Animal Science*. 92, 189 – 197.
- Rymarquis, L.A., D.C. Higgs y D.B. Stern (2006). Nuclear suppressors define three factors that participate in both 5' and 3' end processing of mRNAs in *Chlamydomonas* chloroplasts. *Plant Journal*. 46, 448 – 461.
- Salvador, M.L., L. Suay, I.L. Anthonisen y U. Klein (2004). Changes in the 5'-untranslated region of the *rbcL* gene accelerate transcript degradation more than 50-fold in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current Genetics*. 45, 176 – 182.
- Schaefer, A. y W.M. Koppe (1995). Effect of a microbial phytase on utilization of native
-

- phosphorus by carp in a diet based on soybean meal. *Water Science Technology*. 31(1), 149 – 55.
- Scheuermann, S.E., H.J. Lantzsch y K.H. Menke (1988). *In vitro* and *in vivo* experiments on the hydrolysis of phytate: Activity of plant phytase. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 60, 64 – 75.
- Schlemmer, U., W. Frolich, R.M. Prieto y F. Grases (2009). Phytate in foods and significance for humans: food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis. *Molecular Nutrition and Food Research*. 53, S330 - S375.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) (2000) Centro de Estadística Agropecuaria, SAGAR [Online] (Actualizado noviembre 2000). Disponible en: <http://www.sagar.gob.mx/> [Acceso julio 2015].
- Secretaría de Hacienda y Crédito Público (2014) Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero (Panorama del porcino) [Online] (Actualizado mayo 2014). Disponible en: [http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama%20Porcino%20\(may%202014\).pdf](http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama%20Porcino%20(may%202014).pdf) [Acceso julio 2015].
- Selle, P. H. y V. Ravindran (2007). Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology*. 135, 1 – 41.
- Selle, P.H. y V. Ravindran (2008). Phytate-degrading enzymes in pig nutrition. *Livestock Science*. 115, 99 – 122.
- Selle, P.H., A.J. Cowieson y V. Ravindran (2009). Consequences of calcium interactions with phytate and phytase for poultry and pigs. *Livestock Science*. 124, 126 – 141.
- Selle, P.H., V. Ravindran, W.L. Bryden y T. Scott (2006). Review: Influence of dietary phytate and exogenous phytase on amino acid digestibility in poultry. *Journal of Poultry Science*. 43, 89 – 103.
- Seynaeve, M., G. Janssens, M. Hesta, C. Van Nevel y R.O. De Wilde (2000). Effects of dietary Ca/P ratio, P level and microbial phytase supplementation on nutrient
-

digestibilities in growing pigs: breakdown of phytic acid, partition of P and phytase activity along the intestinal tract. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 83, 193 – 204.

Shimizu, K., H. Kawabe, S. Minami, T. Honda, K. Takaishi, H. Shirataki y Y. Takai (1996). SMAP, an Smg GDS-associating protein having arm repeats and phosphorylated by Src tyrosine kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 271, 27013 – 27017.

Shin, S., N.C. Ha, B.C. Oh, T.K. Oh y B.H. Oh (2001). Enzyme mechanism and catalytic property of β -propeller phytase. *Structure* 9, 851 – 858.

Simon, O. y F. Igbasan (2002). *In vitro* properties of phytases from various microbial origins. *International Journal of Food Science and Technology*. 37, 813 – 822.

Simons, P.C.M., H.A.J. Versteegh, A.W. Jongbloed, P.A. Kemme, P. Slump y K.D. Bos (1990). Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. *British Journal of Nutrition*. 64, 525 – 540.

Spears, J.W. (1999). Review: Reevaluation of the metabolic essentiality of the minerals. *Asian Australasian Journal of Animal Science*. 12, 1002 – 1008.

Specht, E., S. Miyake-Stoner y S. Mayfield (2010). Micro-algae come of age as a platform for recombinant protein production. *Biotechnology Letters*. 32(10), 1373 – 1383.

Stefan, H., K. Anja, S. Edzard, B. Joerg, L. Markus y Z. Oskar (2005). Biotechnological production and applications of phytases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 68(5), 588 – 97.

Stephens, E., I.L. Ross, Z. King, J.H. Mussnug, O. Kruse, C. Posten, M.A. Borowitzka y B. Hankamer (2010). An economic and technical evaluation of microalgal biofuels. *Nature Biotechnology*. 28(2), 126 – 128.

Suay, L., M.L. Salvador, E. Abesha y U. Klein (2005). Specific roles of 5' RNA secondary structures in stabilising transcripts in chloroplasts. *Nucleic Acids Research*. 33, 4754 – 4761.

Sugiura, S.H., J. Gabaudan, F.M. Dong y R.W. Hardy (2001). Dietary microbial phytase supplementation and the utilization of phosphorus, trace minerals and protein

- by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) fed soybean meal-based diets. *Aquaculture Research*. 32, 583 – 592.
- Sugiura, S.H., V. Raboy, K.A. Young, F.M. Dong y R.W. Hardy (1999). Availability of phosphorus and trace elements in low phytate varieties of barley and corn for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*.170, 285 – 296.
- Sun, M., K.X. Qian, N. Su, et al. (2003). Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Biotechnology Letters*. 25, 1087 – 1092.
- Surzycki, R., K. Greenham, K. Kitayama, F. Dibal, R. Wagner, J.D. Rochaix, T. Ajam y S. Surzycki (2009). Factors effecting expression of vaccines in microalgae. *Biologicals*. 37, 133 – 138.
- Suzuki, U., K. Yoshimura y M. Takaishi (1907). About the enzyme “phytase”, which splits anhydro-oxy-methylene diphosphoric acid. *Bulletin of the College of Agriculture, Tokyo Imperial University, German*. 7, 503 – 512.
- Tamim, N.M., R. Angel y M. Christman (2004). Influence of dietary calcium and phytase on phytate phosphorus hydrolysis in broiler chickens. *Poultry Science*. 83, 1358 – 1367.
- The poultry site (2015) GLOBAL POULTRY TRENDS 2014 - Americas' Share of Global Chicken Output Declines [Online] (Actualizado enero 2015). Disponible en: <http://www.thepoultrysite.com/articles/3322/global-poultry-trends-2014-americas-share-of-global-chicken-output-declines/> [Acceso mayo 2015].
- Thompson, L.U., C.L. Button y D.J.A. Jenkins (1987). Phytic acid and calcium affect the in vitro rate of navy bean starch digestion and blood glucose response in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*. 46, 467 – 473.
- Twomey, L., J.R. Pluske, J.B. Rowe, M. Choct, W. Brown y M.F. McConnell (2003). The effects of increasing levels of soluble non-starch polysaccharides and inclusion of feed enzymes in dog diets on faecal quality and digestibility. *Animal Feed Science and Technology*. 108, 71 – 82.
- Urbano, G., M. Lopez-Jurado, P. Aranda, C. Vidal-Valverde, E. Tenorio y J. Porres (2000). The role of phytic acid in legumes: anti-nutrient or beneficial function.
-

Journal of Physiology and Biochemistry. 56, 283 – 294.

Vaistij, F.E., E. Boudreau, S.D. Lemaire, M. Goldschmidt-Clermont y J.D. Rochaix (2000). Characterization of *Mbb1*, a nucleus-encoded tetratricopeptide-like repeat protein required for expression of the chloroplast *psbB/psbT/psbH* gene cluster in *Chlamydomonas reinhardtii*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 97, 14813 – 14818.

Van der Klis, J.D., H.A.J. Versteegh, P.C.M. Simons y A.K. Kies (1997). The efficacy of phytase in corn–soybean meal-based diets for laying hens. Poultry Science, 76, 1535 – 1542.

van Etten, R.L., R. Davidson, P.E. Stevis, P.E., H. MacArthur y D.L. Moore (1991). Covalent structure, disulfide bonding, and identification of reactive surface and active site residues of human prostatic acid phosphatase. Journal of Biological Chemistry. 266, 2313 – 2319.

Van Gorcom, R.F.M., J.G. Boschloo, A. Kuyvenhoven, J. Lange, A.J. Vark, J.C. Bos, J.A.M. van Balken, P.H. Powles, C. van den Hondel (1990). Isolation and molecular characterization of the benzoate-para-hydroxylase gene (*bphA*) of *Aspergillus niger*: a member of a new gene family of the cytochrome P450 superfamily. Molecular Genetics and Genomics. 223, 71 – 77.

Viveros, A., C. Centeno, A. Brenes, R. Canales y A. Lozano (2000). Phytase and acid phosphatase activities in plant feedstuffs. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48, 4009 – 4013.

Walker, T.L., S. Purton, D.K. Becker y C. Collet (2005). Microalgae as bioreactors. Plant Cell Reports. 24, 629 – 641.

Walsh, G. (2010). Biopharmaceutical benchmark 2010. Natural Biotechnology. 28(9), 917 – 924.

Walz, O.P. y J. Pallauf (2002). Microbial phytase combined with amino acid supplementation reduces P and N excretion of growing and finishing pigs without loss of performance. International Journal of Food Science and Technology. 37, 835 – 848.

Wang, Y., B. Yao, H. Zeng, X. Shi, S. Cao y T. Yuan (2001). Purification and property

- of neutral phytase from *Bacillus subtilis*. Weishengwu Xuebao. 41, 198 – 203.
- Wells, S.E., P.E. Hillner, R.D. Vale y A.B. Sachs (1998). Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Molecular Cell*. 2, 135 – 140.
- Wobbe, L., O. Blifernéz, C. Schwarz, J.H. Mussnug, J. Nickelsen y Kruse (2009). Cysteine modification of a specific repressor protein controls the translational status of nucleus-encoded LHCII mRNAs in *Chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106, 13290 – 13295.
- Wu, Y.B., V. Ravindran, W.H. Hendriks, P.C.H. Morel y J. Pierce (2004). Evaluation of a microbial phytase, produced by solid-state fermentation, in broiler diets. II. Influence on phytate hydrolysis, apparent metabolizable energy, and nutrient utilization. *Journal of Applied Poultry Research*. 13, 561 – 569.
- Wu-Scharf, D., B. Jeong, C. Zhang y H. Cerutti (2000). Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-box RNA helicase. *Science*. 290(5494), 1159 – 1162.
- Wyss, M., R. Brugger, A. Kronenberger, R. Rémy, R. Fimbel y G. Oesterhelt (1999). Biochemical characterization of fungal phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase): Catalytic properties. *Applied Environmental Microbiology*. 65, 367 – 373.
- Xiao, K., M.J. Harrison y Z. Wang (2005). Transgenic expression of a novel *M. trunculata* phytase gene results in improved acquisition of organic phosphorus by *Arabidopsis*. *Planta*. 222, 27 – 36.
- Yan, W., R.C. Reigh y Z. Xu (2002). Effects of fungal phytase on utilization of dietary protein and minerals, and dephosphorylation of phytic acid in the alimentary tract of channel catfish *Ictalurus punctatus* fed an all-plant protein diet. *Journal of the World Aquaculture Society*. 33, 10 – 22.
- Yao, M. Z., Y. H. Zhang, W. L. Lu, M. Q. Hu, W. Wang y A.H. Liang (2012). Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications. *Journal of Applied Microbiology*. 112(1), 1 – 14.
- Yi, Z. y E.T. Kornegay (1996). Sites of phytase activity in the gastrointestinal tract of young pigs. *Animal Feed Science and Technology*. 61, 361 – 368.
-

- Yoon, S.M., S. Kim, K. Li, B. Yoon, S. Choe y M. Kuo (2011). Transgenic microalgae expressing *Escherichia coli AppA* phytase as feed additive to reduce phytate excretion in the manure of young broiler chicks. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 91(3), 553 – 563.
- Yu, F.N. y D.Z. Wang (2000). The effects of supplemental phytase on growth and the utilization of phosphorus by crucian carp *Carassius carassius*. *Journal of Fish Science of China*. 7(2), 106 – 109.
- Yu, S., A. Cowieson, C. Gilbert, P. Plumstead y S. Dalsgaard (2012). Interactions of phytate and *myo*-inositol phosphate esters (IP1-5) including IP5 isomers with dietary protein and iron and inhibition of pepsin. *Journal of Animal Science*. 90, 1824 – 1832.
- Zhang, Z.B., E.T. Kornegay, J.S. Radcliffe, J.H. Wilson y H.P. Veit (2000). Comparison of phytase from genetically engineered *Aspergillus* and canola in weanling pig diets. *Journal of Animal Science*. 78(11), 2868 – 2878.
- Zeng, Z.K., D. Wang, X.S. Piao, P.F. Li, H.Y. Zhang, C.X. Shi y S.K. Yu (2014). Effects of adding super dose phytase to the phosphorus-deficient diets of young pigs on growth performance, bone quality, minerals and amino acids digestibilities. *Asian-Australas Journal of Animal Science*. 27, 237 – 246.
- Zhan, H.H., C.S. Gao, Z.X. Qi y M.S. Du (2004). General review of phytase application in feed. *Journal of Henan Aquaculture*. 3, 31 – 33.
- Zhu, J. (2012). Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnology Advances*. 30, 1158 – 1170.

CAPÍTULO II

2. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *phyASr* EN LÍNEAS TRANSPLASTÓMICAS DE *C. reinhardtii*.

2.1 INTRODUCCIÓN

Los ingredientes de la dieta para animales monogástricos son ricos en fósforo (P), sin embargo aun se requiere la administración de suplementos de fósforo inorgánico (Pi) para obtener un buen rendimiento durante el crecimiento del animal. El fitato (*myo*-inositol hexakisfosfato), generalmente se encuentra como un complejo de sales de calcio, magnesio y potasio y/o proteínas, y es la principal forma de almacenamiento de P en plantas, representando del 60 al 90% del P total presente en cereales, semillas oleaginosas y legumbres (Graf, 1986). Sin embargo, los animales monogástricos (por ejemplo, cerdos, aves de corral y pescado) utilizan pobremente el fitato, debido a que son deficientes en la síntesis de enzimas específicas para su hidrólisis en el tracto gastrointestinal. En gran parte, el fitato se encuentra intacto al paso del tracto digestivo, disminuyendo la biodisponibilidad de los nutrientes como minerales quelantes (por ejemplo, calcio y zinc), aminoácidos y proteínas (Graf, 1986).

La excreción del P unido al fitato ocasiona un grave problema de contaminación, lo que contribuye a la eutrofización de las aguas superficiales en las zonas donde la producción de ganado monogástricos es intensiva. La ineficiencia en los sistemas de producción animal y la contaminación causada por el exceso de P en el ambiente, pueden abordarse eficazmente mediante la adición de la enzima fitasa en la dieta de animales monogástricos. Las fitasas (*myo*-inositol hexakisfosfato fosfohidrolasa; EC 3.1.3.8, EC 3.1.3.72 y EC 3.1.3.26) son enzimas hidrolíticas que catalizan la ruptura de los enlaces fosfomonoéster del fitato, para liberar *myo*-inositol y Pi para su posterior absorción en el intestino. Además de disminuir la suplementación de Pi y reducir la cantidad de contaminantes de las excretas, las fitasas también disminuyen los efectos anti-nutricionales del fitato.

Las fitasas se encuentran en tejidos animales y vegetales (predominantemente semillas) y en una variedad de microorganismos (Cheng *et al.*, 1999). A pesar de la variedad de fuentes potenciales de la fitasa, sólo los hongos del suelo como, *Aspergillus niger* o *Aspergillus ficuum*, se utilizan actualmente para la producción comercial de la enzima. La fitasa producida por *A. ficuum* posee mayor actividad

específica (100 U mg⁻¹ de proteína; cuyas unidades se definen como moles de fosfato liberado por minuto) y termoestabilidad en comparación con los fitasas que se han caracterizado a partir de otros microorganismos (Cheng *et al.*, 1991). Así mismo, esta enzima es una fitasa ácida que exhibe poca actividad por arriba de un pH de 5.5 (Howson y Davis, 1983). En consecuencia, la actividad está limitada a una región relativamente pequeña en el tracto digestivo del animal monogástrico, donde el pH oscila entre 2.0 y 3.0 en el estómago, y de 4.0 a 7.0 en el intestino delgado.

Aunque la idea de la suplementación con fitasa en las dietas de animales monogástricos se propuso hace más de 25 años (Cheng *et al.*, 1991), el alto costo de la producción de enzimas ha restringido el uso de fitasas en la industria ganadera. En América del Norte, la fitasa como aditivo alimenticio es generalmente más costosa que los suplementos de Pi. En algunas circunstancias, el costo de utilización de la fitasa puede ser parcialmente compensado si el uso de esta enzima también disminuye la necesidad de suplementación de un segundo nutriente como, el calcio. El uso de la fitasa en América del Norte es probable que aumente, ya que las poblaciones de cerdos, aves de corral y peces, han aumentado las presiones públicas que obligan a reducir la contaminación asociada con la producción ganadera intensiva. Los altos costos de los suplementos de Pi y una legislación que exige el uso de la fitasa, han hecho que el uso de esta enzima como aditivo alimenticio sea comúnmente empleado en Europa y partes del Oriente, que en América del Norte. Los gobiernos de los Países Bajos, Alemania, Corea y Taiwán han promulgado la legislación para reducir la contaminación por P creado por la producción ganadera de animales monogástricos.

El costo de la fitasa puede reducirse disminuyendo los costos de producción y/o la producción de una enzima con actividad superior. Los recientes avances en la biotecnología han revolucionado la industria de las enzimas comerciales, ofreciendo alternativas y métodos eficaces para su producción. La aplicación de la tecnología del ADN recombinante ha permitido a los fabricantes aumentar los rendimientos y la eficiencia de producción de la enzima, creando nuevos productos. El organismo fuente original ya no tiene por qué limitar la producción de enzimas comerciales. Los genes que codifican enzimas superiores pueden ser transferidos a organismos heterólogos, que por lo general, éstos deben ser sistemas biorreactores más prácticos y menos costosos para la producción de enzimas comerciales.

Dada la importancia comercial que han alcanzado las fitasas, se han hecho diversos

estudios para incrementar la producción de estas enzimas mediante técnicas de ingeniería genética, principalmente en biorreactores que requieran un procesamiento de menor costo a los utilizados actualmente. Es por ello que se propone a la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* por presentar diversas ventajas en comparación con los sistemas convencionales para la producción de proteínas recombinantes. Tales ventajas son: los bajos costos de producción, su rápida escalabilidad en un cultivo homogéneo, no son susceptibles a infecciones virales o patógenos que son dañinos para el humano, presentan una maquinaria tanto eucariótica como procariótica que le permite plegar una variedad de proteínas complejas con precisión, tienen la capacidad de crecer tanto en condiciones fotoautotróficas como heterotróficas en presencia de una fuente de carbono como el acetato, y tienen un ciclo sexual rápido y controlable con haploides estables y viables (Specht *et al.*, 2010). Así mismo, *C. reinhardtii* es la especie de microalga mejor caracterizada, puesto a que los tres genomas que posee (cloroplástico, nuclear y mitocondrial) han sido completamente secuenciados, y a su vez, se disponen de protocolos de transformación y vectores para cada uno de estos genomas (Merchant *et al.*, 2007).

Previamente en el laboratorio de Biotecnología de Microalgas del CICY se generó un plásmido (*pChPhy*) que contiene el gen *phyASr* que se encuentra fusionado con el promotor *atpA* y el terminador *psbA*. Dicho gen codifica para la fitasa de la bacteria anaeróbica ruminal *Selenomonas ruminantium*. Esta construcción fue concebida como una herramienta que permitió la transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii* para su uso como biorreactor en la producción recombinante de esta fitasa (Rivera-Solís, 2013), la cual pertenece a la clase de proteínas fosfatasas de tirosina (PTP) o también conocidas como fitasas de cisteína (Chu *et al.*, 2004).

La secuencia del gen fue seleccionada por presentar propiedades atractivas para ser usada como aditivo alimenticio, debido a su alta actividad específica (400U mg⁻¹ cuando ha sido expresada en *E. coli*), amplio rango de pH al cual se encuentra activa (3.0 a 6.0) y resistencia a la actividad de proteasas (Cheng *et al.*, 1999).

Así mismo, el gen *phyASr* fue seleccionado debido a que, a diferencia de los animales monogástricos, las fitasas a partir de microorganismos del rumen de animales poligástricos, tienen una alta actividad usando fitato como sustrato. Además se ha reportado que los rumiantes criados con un alimento a base de granos ricos en fitato, no requieren la suplementación de Pi en la dieta debido a estas fitasas ruminales

(Raun *et al.*, 1956).

El objetivo de este capítulo fue evaluar la expresión gen *phyASr* de cinco líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* mediante RT-PCR de punto final y RT-PCR de tiempo real (qRT-PCR).

2.2 MATERIAL Y MÉTODOS

2.2.1 Cepa de *C. reinhardtii* y condiciones de cultivo

Los cultivos utilizados para los siguientes experimentos fueron cinco líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* que contienen el gen *phyASr*. Dichas líneas tienen como nomenclatura: 13-1 (línea 1), 21-1 (línea 2), 25-2 (línea 3), 29-7 (línea 4) y B3-3 (línea 5), y fueron proporcionadas por la I.B.Q. Shirley Bernardo Candellero del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). Así mismo, se empleó la cepa silvestre de *C. reinhardtii* CC-125 (mt+) donada por la Dra. Elizabeth Harris del Centro de *Chlamydomonas reinhardtii* (Universidad de Duke, Durham, Carolina del Norte. EUA; www.chlamy.org) y actualmente depositada en el laboratorio de Biotecnología de Microalgas (clave: BTD04) de la Unidad de Biotecnología del CICY.

El mantenimiento de los cultivos se realizó de manera axénica, en medio Tris-Acetato-Fosfato (TAP) pH 7.0 (Gorman y Levine, 1965) a 25 ± 2 °C, bajo un fotoperiodo de 16 h:8 h (luz:oscuridad) con una intensidad lumínica de $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proveniente de lámparas MAGG F54T5/6500 K, en un orbitador a 140 rpm (Thermo Scientific, modelo MAXQ 4450) (Lilly *et al.* 2002). El periodo de incubación de los cultivos fue de 7 días. En el caso de las cepas transplastómicas, éstas fueron cultivadas en 50 mL de medio TAP (Harris, 1989) conteniendo 50 μL de espectinomicina (100 mg/mL) en un matraz de 250 mL, mientras que la cepa silvestre fue cultivada en 50 mL de medio TAP sin antibiótico en un matraz de 250 mL.

- a) Preparación de las soluciones stock

Buffer de fosfatos	
Componentes	Para 100 mL (g)
K_2HPO_4	10.8
KH_2PO_4	5.6

Solución A	
Componentes	Para 500 mL (g)
NH ₄ Cl	20
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.5

Solución de metales traza de Hunter	
Componentes	Para 500 mL (g)
H ₄ BO ₃	5.7
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	11
MnCl ₂ ·4H ₂ O	2.53
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.495
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.805
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.785
Mo ₇ O ₂₄ (NH ₄) ₆ ·H ₂ O	0.5

- b) Preparación del medio TAP (Tris-Acetato-Fosfato) (Harris, 1989).

Soluciones stock	Volumen para 1 litro de solución (mL)
1M de Tris base	20
Buffer de Fosfato II	1
Metales traza de Hunter	1
Solución A	10
Ácido acético glacial	1

*La solución se ajustó a un pH de 7.0

2.2.2 Conteo celular de los cultivos de *C. reinhardtii*

Al finalizar el periodo de incubación al séptimo día de cultivo (fin de la fase exponencial de crecimiento) se determinó la concentración celular por conteo de células en una cámara de Neubauer (hemocitómetro). Para ello, se colectaron 900 µL del cultivo celular de 50 mL, y se colocaron en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL tipo Eppendorf y se le adicionaron 100 µL de una solución de yoduro de lugol para la fijación de la muestra (Mcmanus y Mowry, 1964). Posteriormente se colocaron en el

orbitador (vortex) a 100 rpm para la homogenización de la muestra. Después se tomaron 20 µL de la muestra fijada y se colocaron en la cámara de Neubauer para llevar a cabo el conteo. Se contaron todas las células localizadas en los cinco campos visuales situados en la cuadrícula pequeña de la cámara, siguiendo siempre las manecillas del reloj (Figura 2.1).

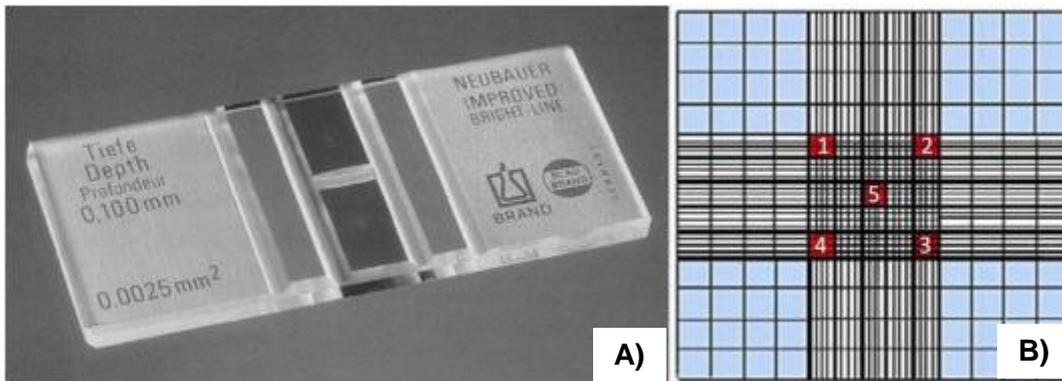


Figura 2.1 A) Cámara de Neubauer; B) división de la celda de la cámara de Neubauer. En rojo se indican los cinco campos visuales utilizados para realizar el conteo de las células de *C. reinhardtii*. Los números indican el orden en el cual se realizó el conteo.

Se realizaron dos conteos por muestra (uno por sección de la cámara) y se obtuvo un promedio. Los cálculos para determinar el número de células por mL de cultivo, se obtuvieron a partir de la siguiente fórmula (Hansen, 2000):

$$C = (N) (50,000) (F)$$

Donde C= cantidad de células/mL; N= promedio del número de células contadas; F= factor de dilución; 50, 000= factor de conversión.

2.2.3 Colecta celular

La colecta de cada uno de los cultivos celulares, tanto de las líneas transplastómicas como la línea silvestre, se realizaron en campana de flujo laminar. Al finalizar la cuantificación celular, se colectaron los 49 mL de cultivo restante en un tubo Falcon de 50 mL (nuevo y estéril), el cual se centrifugó a 4,216 rpm a 4 °C durante cinco minutos (Ultracentrífuga Eppendorf modelo 5804R). Después se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla celular en un volumen de medio TAP suficiente para obtener 50 millones de células por 1 mL. Posteriormente, una vez resuspendida la pastilla celular de cada uno de los cultivos, se realizaron alícuotas de 1 mL en tubos Eppendorf

(nuevos y estériles), los cuales se centrifugaron a 3,000 rpm por cinco minutos (centrífuga Eppendorf modelo 5418), y se les retiró el sobrenadante obteniendo una pastilla de aproximadamente 0.1 mL. Después, los tubos se colocaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se usaron para la extracción de ARN total inmediata, o fueron almacenados a -80 °C para su uso posterior.

2.2.4 Diseño de oligonucleótidos

Para llevar a cabo la evaluación de expresión del transgen *phyASr* de las líneas transplastómicas, se requirió el diseño de oligonucleótidos (cebadores) específicos del gen heterólogo *phyASr* y el gen constitutivo *rpl16* de *C. reinhardtii*. Se solicitó la síntesis de los oligonucleótidos para cada una de las secuencias a Sigma-Aldrich.

En el Cuadro 2.1 se describen las características necesarias de las secuencias de oligonucleótidos de los genes *phyASr* y *rpl16*, las cuales se incluyen: el nombre y la secuencia del oligonucleótido, su localización en la secuencia de interés, y el tamaño del amplicón estimado a partir de ADN complementario (ADNc)

Cuadro 2.1 Secuencia de oligonucleótidos de los genes *phyASr* y *rpl16*.

Nombre	Oligonucleótido ID	Secuencia del oligonucleótido (5'3')	Localización en la secuencia de interés (nt)	Amplicón estimado en ADNc (pb)
<i>phyASr</i>	FwPhyAsrCr1	TGATGCTTTACGTGCTCCAG	222	246
	RvPhyAsrCr1	TTAGCCCAATCACGTTCCACC	467	
<i>rpl16</i>	Rpl16rtF	TTCCGTAAACCACACCGTG	58	210
	Rpl16rtRn	AGCAGGACGCATAGTAACAG	270	

2.2.5 Extracción de ARN total

A partir de las alícuotas que se obtuvieron de la colecta celular (sección 2.2.3) se realizó la extracción de ARN de las líneas transplastómicas y de la línea silvestre de *C. reinhardtii*. Se utilizó el protocolo basado en el reactivo de Trizol (Invitrogen) a partir de una concentración celular de 100 millones de células mL⁻¹.

Las muestras se tomaron directamente del nitrógeno líquido para su transportación (en este caso se encontraban almacenadas a -80 °C) y se mantuvieron en él hasta el momento de empezar el proceso de extracción.

Posteriormente, se le adicionó a cada muestra 1000 µL del reactivo de TRIZOL

(Invitrogen) y se mezcló por pipeteo hasta desprender y resuspender completamente la pastilla celular. Durante ese proceso las muestras se mantuvieron en hielo hasta terminar de resuspender las muestras restantes. Después, éstas fueron homogenizadas por vortex (Vortex Genie-2, Scientific Industries) por 1 minuto y se centrifugaron a 10,700 rpm por 10 minutos (centrífuga Eppendorf modelo 5418). El sobrenadante obtenido después de la centrifugación se recuperó y se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Posteriormente, las muestras se dejaron incubando a 20 °C por 5 minutos, se les adicionó 200 µL de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y se agitaron vigorosamente con ayuda del vórtex durante 30 segundos. Posteriormente, las muestras se incubaron a 20 °C por 3 minutos, y se centrifugaron a 10,700 rpm por 15 minutos. Luego al finalizar la centrifugación se recuperó el sobrenadante de cada muestra y fue transferido a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Posteriormente al sobrenadante recuperado se le adicionó un volumen igual de isopropanol al 100%, seguido de una agitación por inversión por 20 segundos, y se dejó incubando a 20°C por 10 minutos. Al finalizar el periodo de incubación las muestras se centrifugaron a 10,700 rpm por 10 minutos. Después se retiró cuidadosamente el sobrenadante procurando no perder la pastilla formada. Luego se le adicionó 1000 µL de etanol al 70%, y se agitó gentilmente por inversión por 15 segundos, y se centrifugó a 8,400 rpm por 5 minutos. Finalizado el tiempo de centrifugación, se desechó el sobrenadante procurando no dejar residuos de etanol.

Después la pastilla de cada una de las muestras se dejó secar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Una vez seca, se resuspendió en 39 µL de H₂O ultra pura (H₂O UP) y se le adicionó 40 U del inhibidor de ARNasa (40 U/µL, Invitrogen), 5 µL del amortiguador 10X (Promega) y 5 U de DNAasa (1 U/µL, Promega), para tener un volumen final de 50 µL. La mezcla fue homogenizada suavemente con el vórtex, y tras la homogenización, las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 30 minutos.

Posteriormente, a las muestras se les adicionó 700 µL de la solución SSTE plus y 700 µL de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), seguido de una agitación con el vórtex durante 15 segundos. Después se centrifugaron las muestras a 10,700 rpm por 10 minutos y se recuperó el sobrenadante transfiriéndolo a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Luego al sobrenadante recuperado se le adicionó un volumen igual de isopropanol al 100% y 0.1 volumen de acetato de sodio 3.0 M, seguido de una agitación gentil por inversión por 20 segundos y se dejó incubando a 20°C por 10 minutos. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 10,700 rpm

durante 10 minutos, y se desechó el sobrenadante tratando de conservar la pastilla.

Después se realizó un lavado a cada pastilla adicionando 1000 μL de etanol al 70%, con posterior centrifugación a 8,400 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se retiró tratando de no dejar ningún resto de etanol, mientras que la pastilla se dejó secando a temperatura ambiente por 10 minutos y una vez seca, se resuspendió en 40 μL de H_2O UP.

La integridad y la pureza del ARN total de cada muestra se evaluó por electroforesis en un gel de agarosa-TAE 1X (Tris-acetato 0.04 M, EDTA 1mM, pH 8.0) al 1% (p/v) teñido con bromuro de etidio. La electroforesis se desarrolló en el amortiguador TAE 1X a un voltaje constante de 85 V por 30 minutos.

La concentración y pureza del ARN se calculó por medio de un espectrofotómetro (SmartSpect plus de BioRad). Para ello se tomaron 5 μL de muestra más 95 μL de H_2O UP para obtener una dilución 1:20. Finalmente, las extracciones de ARN fueron almacenadas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ para su uso inmediato o a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ para su almacenamiento prolongado.

2.2.6 Síntesis de ADNc

La síntesis de ADNc fue basado en el protocolo de la enzima Superscript III siguiendo las especificaciones del fabricante (Invitrogen) mediante transcripción reversa y la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Para ello se partió de una cantidad inicial de 5 μg de ARN total como molde. El ARN se mezcló con 50 ng/mL de Hexámeros (Invitrogen) más H_2O UP para obtener un volumen total de 20 μL . Después se incubó a $75\text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 minutos e inmediatamente se colocó en hielo. Posteriormente, se realizó la reacción de la transcriptasa reversa, para lo cual se dividió la muestra anterior en dos tubos, el primero como muestra experimental y el segundo como control negativo (sin adición de la transcriptasa reversa).

La mezcla de reacción para la RT-PCR consistió de lo siguiente: 10 μL de muestra (ARN + hexámeros), amortiguador First Strand (1X), 10 mM de DTT (0.1 M, Invitrogen), 1 mM de dNTPs (10 mM, Roche), 40 U del inhibidor de ARNasa (40 U/ μL , Invitrogen), 200 U de la enzima Superscript III (200 U/ μL , Invitrogen), y finalmente H_2O UP, para tener un volumen final de 20 μL por muestra. Las muestras se incubaron a $50\text{ }^\circ\text{C}$ durante 90 minutos, seguido de la inactivación de la reacción a $75\text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 minutos. Posteriormente a las muestras se les adicionó 4 μL de ARNasa A (100 mg/mL, Sigma) y se dejaron incubando a $37\text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos. Al finalizar el

periodo de incubación, a las muestras se les realizó una dilución 1:5 y 1:8. Los tubos se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Como control para los experimentos de RT-PCR se empleó el gen del cloroplasto *rpl16*, cuyos oligonucleótidos permitieron obtener un amplicón de 210 pb en ADNc. El *rpl16* al ser un gen constitutivo se utilizó como control positivo para corroborar que la carga en el gel haya sido homogénea y que los componentes de la reacción de RT-PCR funcionaran adecuadamente. Estos oligonucleótidos también se usaron como control negativo en la muestra sin retrotranscriptasa donde no se debe observar amplificación, ya que un amplicón de aproximadamente 200 pb sería un indicador de contaminación con ADN genómico (ADNg).

2.2.7 Análisis de la calidad del ADNc

El estudio se llevó a cabo por RT-PCR de punto final usando un termociclador C1000 Touch™ (Bio-Rad). Se emplearon los oligonucleótidos del gen *rpl16* que fueron diseñados y sintetizados en la sección 2.2.4. (Cuadro 2.1.). La reacción de PCR consistió de los siguientes componentes: 10 µL de template de ADNc a partir de la dilución 1:8, 10 µM de oligonucleótido sentido (1 µL), 10 µM de oligonucleótido antisentido (1 µL), 200 nM de dNTP's (1 µL), 50 mM de MgCl₂ (1.5 µL), amortiguador de PCR 10X (1X), H₂O UP (30.3 µL) y 5 U/µL de Taq polimerasa (1 U) (Invitrogen/Life Technologies). El volumen total de la reacción fue de 50 µL. En este caso se utilizó como control positivo el ADNg de *C. reinhardtii*.

Para el programa de PCR se realizaron ensayos preliminares evaluando diferentes tiempos y temperaturas de alineamiento, y tiempos de desnaturalización. Por lo tanto, el programa general fue el siguiente: 1) desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos, 2) desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, 3) alineamiento de los oligonucleótidos a 55 °C por 30 segundos, 4) extensión a 72 °C durante 30 segundos, 39 repeticiones del paso 2 al 4 y una extensión final por 10 minutos a 72 °C.

2.2.8 Análisis de expresión del gen *phyASr* por RT-PCR de punto final

El análisis de expresión del gen *phyASr* de las líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* se realizó por RT-PCR de punto final usando el termociclador C1000 Touch™ (Bio-Rad). Se utilizaron las muestras de ADNc que fueron generadas en la sección 2.2.6 y los oligonucleótidos del gen *phyASr* que fueron diseñados y sintetizados en la sección 2.2.4 (Cuadro 2.1).

La reacción de PCR consistió de los siguientes componentes: 10 μL de template de ADNc a partir de la dilución 1:8, 10 μM del cebador sentido (1 μL), 10 μM del cebador antisentido (1 μL), 200 nM de dNTP's (1 μL), 50 mM de MgCl_2 (1.5 μL), amortiguador de PCR 10X (1X), H_2O UP (30.3 μL) y 5 U/ μL de Taq polimerasa (1 U) (Invitrogen/Life Technologies). El volumen total de la reacción fue de 50 μL . Como control positivo se utilizó un plásmido (*pChPhy*) que contiene la construcción de expresión del gen *phyASr*, el cual fue proporcionado por Rivera-Solís (2013).

Para el programa de PCR se realizaron ensayos preliminares evaluando diferentes tiempos y temperaturas de alineamiento, y tiempos de desnaturalización. Por lo tanto el programa general fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos, seguido de 39 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos (fase de alineamiento), y 72 °C por 30 segundos; y una extensión final a 72 °C por 10 minutos.

2.2.9 Eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos (*phyASr* y *rpl16*) por RT-PCR de tiempo real (qRT-PCR)

Después de diseñar y obtener los oligonucleótidos de los genes *phyASr* y *rpl16*, fue necesario determinar su eficiencia de amplificación para cada ensayo de qRT-PCR. Para ello, fue generada una curva estándar para determinar la eficiencia, sensibilidad y reproducibilidad del ensayo. Así mismo, fue necesario obtener una curva de disociación (melting curve) para proporcionar mayor certeza y validación de los productos amplificados.

Los puntos de la recta de la curva estándar de cada oligonucleótido se realizaron a partir de diluciones 1:8 para su validación dentro de 12 ciclos de amplificación. Cada punto de la recta se realizó por triplicado. Las reacciones de qRT-PCR para ambos oligonucleótidos (*phyASr* y *rpl16*) se analizaron en paralelo, estas tuvieron un volumen total de 20 μL y consistieron de lo siguiente: 2 μL de template de ADNc de las diluciones previamente generadas, 10 μL de Power SYBR Green PCR Master Mix (Invitrogen/Life Technologies), 200 nM del cebador sentido (0.4 μL), 200 nM del cebador antisentido (0.4 μL) y H_2O UP (5.2 μL).

Para el programa de qRT-PCR se realizaron ensayos preliminares evaluando diferentes tiempos y temperaturas de alineamiento, y tiempos de desnaturalización. Por lo tanto el programa general fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95 °C por 10 minutos, seguido de 39 ciclos a 95 °C por 30 segundos, fase de alineamiento por

30 segundos a 57 °C para los oligonucleótidos *rpl16* y 60 °C para los oligonucleótidos *phyASr*, y 60 °C por 1 minuto; y una extensión final a 72 °C por 30 segundos. Las curvas de disociación fueron analizadas entre 55 a 95 °C después de los 40 ciclos.

2.2.10 Cuantificación relativa de la expresión del gen *phyASr*

Una vez evaluada la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos, se prosiguió con la cuantificación relativa de la expresión del gen *phyASr* de las cinco líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* mediante qRT-PCR. Para ello se requirió la normalización de las muestras mediante la expresión de un gen de referencia endógeno, como el gen *rpl16*, el cual fue analizado en paralelo con las muestras problema que expresan el gen *phyASr*.

Las reacciones de qRT-PCR para ambos genes (*phyASr* y *rpl16*) tuvieron un volumen total de 20 µL y consistieron de lo siguiente: 4 µL de template de ADNc a partir de una dilución 1:8, 10 µL de Power SYBR Green PCR Master Mix (Invitrogen/Life Technologies), 200 nM del cebador sentido (0.4 µL), 200 nM del cebador antisentido (0.4 µL) y H₂O UP (5.2 µL) para obtener un volumen total de 20 µL.

Para el programa de qRT-PCR se realizaron ensayos preliminares evaluando diferentes tiempos y temperaturas de alineamiento, y tiempos de desnaturalización. Por lo tanto, el programa general fue el siguiente: fase de desnaturalización inicial a 95 °C por 10 minutos, seguido de 39 ciclos a 95 °C por 30 segundos, fase de alineamiento por 30 segundos a 60 °C para los oligonucleótidos *phyASr* y 57 °C para los oligonucleótidos *rpl16*, seguido de 60 °C durante 1 minuto; y una fase de extensión final a 72 °C por 30 segundos. Los valores de C_T (threshold cycle) para el gen *phyASr* y para el gen de referencia *rpl16*, se obtuvieron de las medias de tres PCR independientes para cada muestra.

Para el caso de la expresión relativa del gen *phyASr* se calculó de acuerdo con el método de $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak y Schmittgen, 2001). La qRT-PCR se llevó a cabo utilizando un v2.3 StepOne™ Real-Time PCR System y StepOne Software (Invitrogen/Life Technologies). Así mismo, se realizó un análisis estadístico utilizando STATGRAPHICS Plus para Windows versión 4.1 (<http://www.statgraphics.com>). Se utilizó el análisis unidireccional de varianza (ANOVA) para evaluar los diferentes niveles de expresión del gen *phyASr* de las líneas transplastómicas de *C. reinhardtii*. Los valores se obtuvieron a partir de dos réplicas biológicas independientes ±

desviación estándar. Las diferencias significativas se compararon mediante el método de la mínima diferencia significativa de Fisher (Least Significant Difference; LSD) al 95%.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Extracción de ARN total

En la Figura 2.2 se observa la integridad de los transcritos de las dos réplicas biológicas independientes, observándose que las bandas ribosomales (23S, 18S y 16S) de las líneas transplastómicas (13-1, 21-1, 25-2, 29-7 y B3-3) y el de la línea silvestre (S) de *C. reinhardtii* se encuentran definidas y sin degradación. A partir de 5 µg de ARN de cada muestra se realizó la síntesis de ADNc para posteriormente determinar la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos y los niveles de expresión relativa del gen *phyASr* de las líneas transplastómicas.

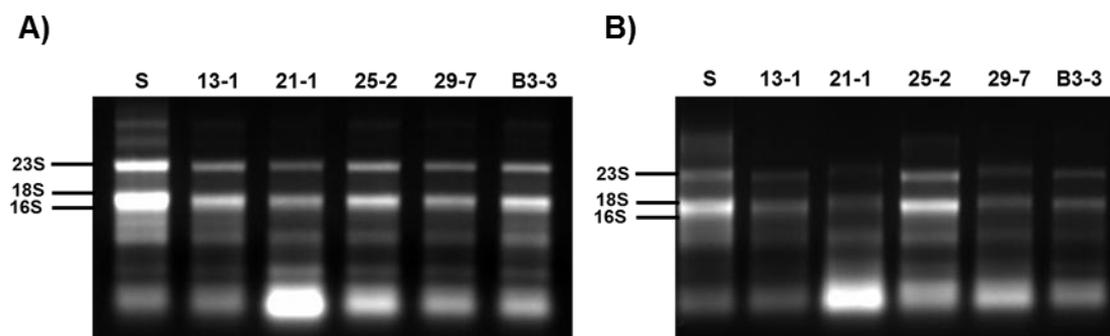


Figura 2.2 Calidad del ARN total extraído de las líneas transplastómicas y la línea silvestre de *C. reinhardtii*. A) Primera réplica, B) Segunda réplica. Pureza = 1.8.

2.3.2 Análisis de la calidad del ADNc

En esta sección se analizó la calidad del ADNc de cada una de las muestras mediante la expresión del gen constitutivo *rpl16* del cloroplasto de *C. reinhardtii*. En la Figura 2.3 se muestra que en ambas replicas biológicas independientes se observó que tanto la línea silvestre como las líneas transplastómicas expresan dicho gen con un tamaño de amplicón de 210 pb. Así mismo, se observó la ausencia de contaminación de ADNg en los extractos de ARN total.

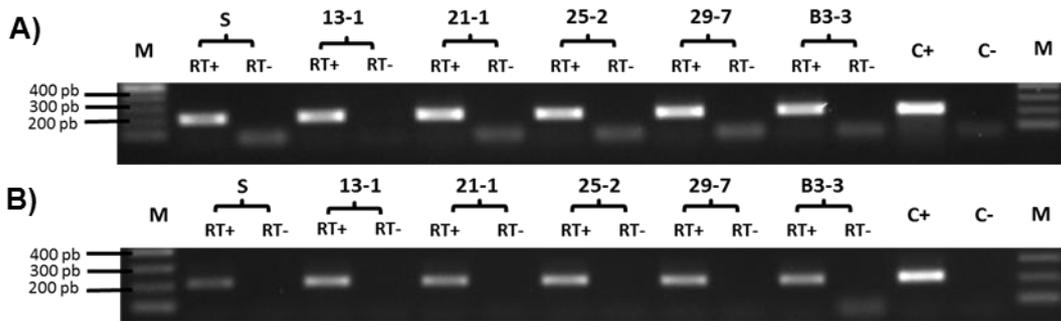
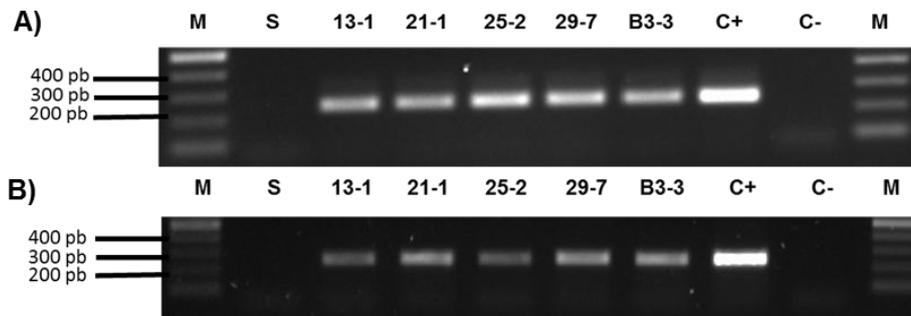


Figura 2.3 Electroforesis de la RT-PCR del gen *rpl16* para verificar la integridad del ADNc de las líneas transplastómicas y línea silvestre de *C. reinhardtii*. A) Primera réplica, B) Segunda réplica. M, marcador de 2 log (NEB); RT+ (adición de la transcriptasa reversa); RT- (sin adición de la transcriptasa reversa); C+, Control positivo (ADNg de *C. reinhardtii*); C-, Control negativo (H₂O UP).

2.3.3 Análisis de expresión del gen *phyASr* por RT-PCR de punto final

En este ensayo se verificó la expresión del gen *phyASr* en las líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* de ambas réplicas independientes, donde se observó que todas las líneas expresaron el gen que codifica a la enzima fitasa de *S. ruminantium* con un tamaño del amplicón de 246 pb, a diferencia de la línea silvestre donde no se observó amplificación alguna como se esperaba (Figura 2.4).



Figura

2.4 RT-PCR del gen *phyASr* en las líneas transplastómicas de *C. reinhardtii*. A) Primera réplica, B) Segunda réplica. C+, Control positivo (plásmido *pChPhy* que contiene el gen *phyASr*); C-, Control negativo (H₂O UP).

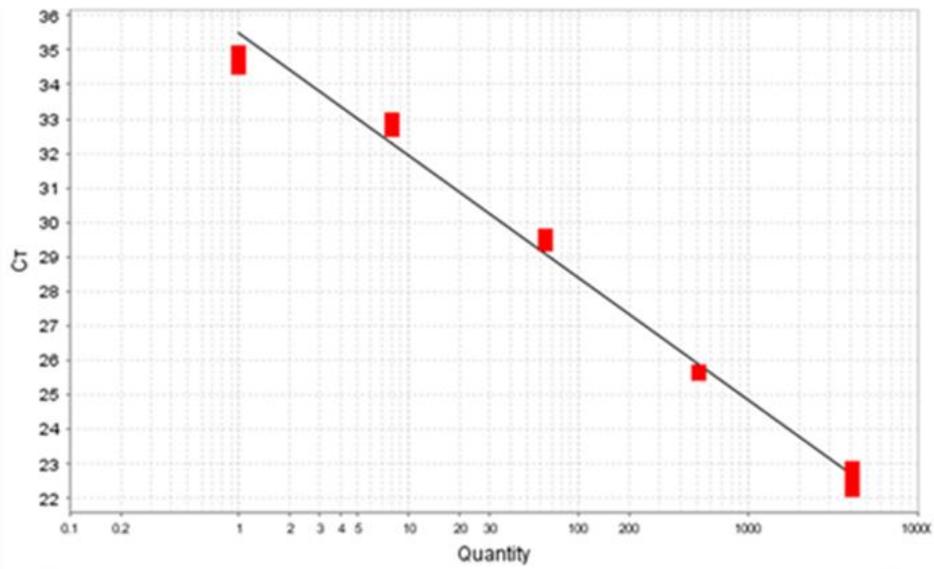
2.3.4 Validación de la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos *rpl16* y *phyASr* mediante qRT-PCR

En las Figuras 2.5A y 2.6A se observa la curva estándar de los oligonucleótidos del gen *rpl16* y gen *phyASr*, donde se obtuvo una R² (coeficiente de correlación) de 0.988

y 0.993 respectivamente. Así mismo, se obtuvo una pendiente (Slope) de -3.544 para el gen *rpl16* y -3.474 para el gen *phyASr*, y una eficiencia de amplificación de 91.49% y 94.03% respectivamente.

Por otra parte, en las Figuras 2.5B y 2.6B se muestra la curva de disociación de ambos oligonucleótidos, donde se obtuvieron en ambas curvas un solo pico representativo, lo que indica que la secuencia de interés de cada gen fue específicamente amplificada, esto significa que solo existe un amplicón que fue disociado a determinada temperatura (T_m).

A)



Target: *rp16* Slope: -3.544 Y-Inter: 35.486 R^2 : 0.988 Eff%: 91.489

B)

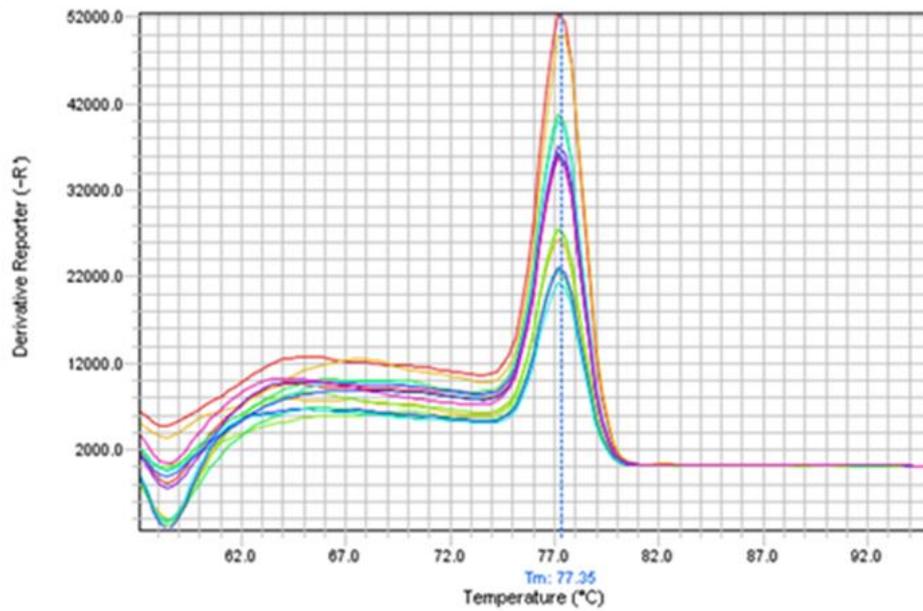
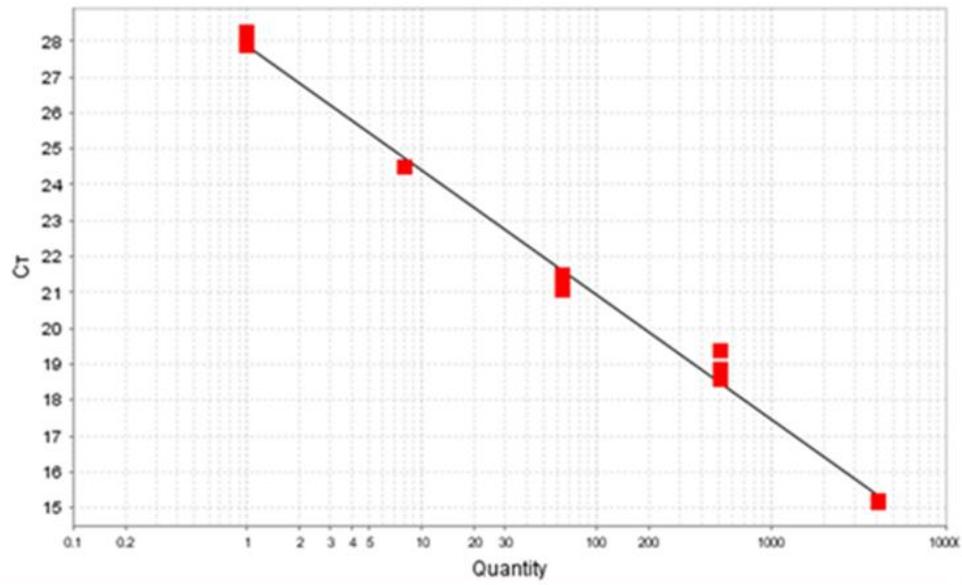


Figura 2.5 Eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos del gen *rp16*
 A) curva estándar, B) curva de disociación.

A)



Target: phyASr Slope: -3.474 Y-Inter: 27.86 R²: 0.993 Eff%: 94.03

B)

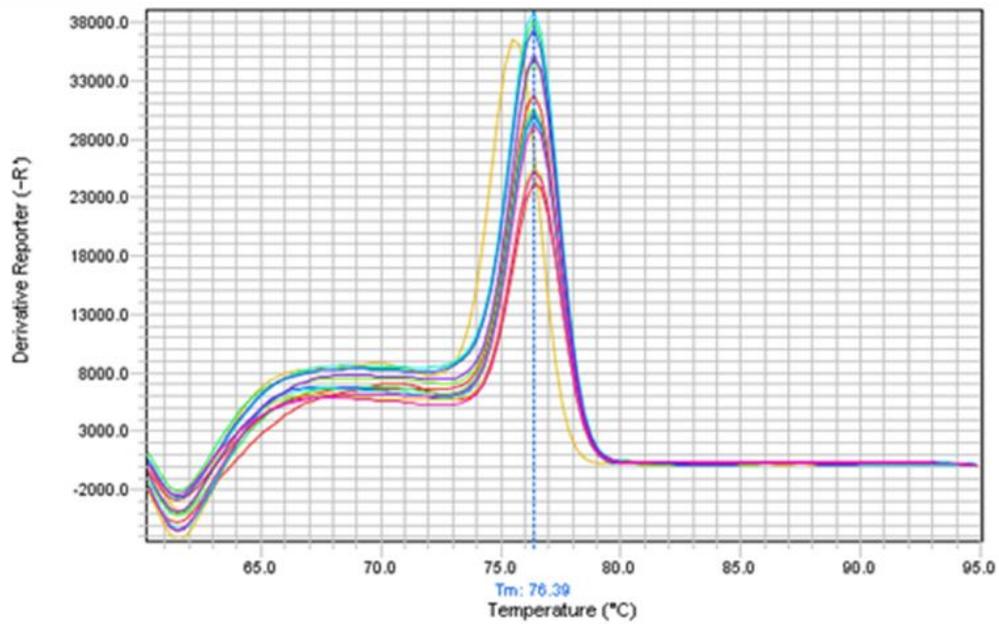


Figura 2.6 Eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos del gen *phyASr*
A) curva estándar, B) curva de disociación.

2.3.5 Cuantificación relativa de la expresión del gen *phyASr*

En la Figura 2.7 se muestran los diferentes niveles de expresión relativa del gen *phyASr* de las cinco líneas transplastómicas de *C. reinhardtii*. Se eligió a la línea 13-1 como muestra control o de referencia para calcular la cantidad relativa de la expresión génica del resto de las líneas de acuerdo al método de $2^{-\Delta\Delta C_T}$. En la gráfica se observa que la línea B3-3 tuvo 3 veces mayor expresión que la línea 13-1. Mientras que las líneas 21-1, 25-2 y 29-7 tuvieron aproximadamente 2 veces mayor expresión que la línea 13-1. Sin embargo, las líneas 21-1 y 25-2 no presentaron una diferencia significativa con respecto a la muestra de referencia.

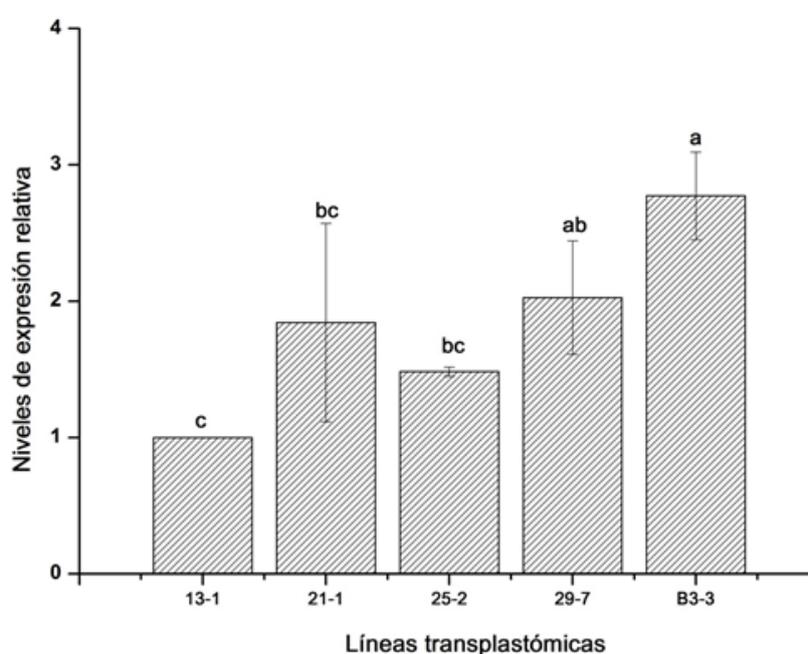


Figura 2.7 Cuantificación relativa de la expresión del gen *phyASr* por qRT-PCR de las cinco líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* ($n=2$). La línea 13-1 fue utilizada como muestra de referencia para calcular la cantidad relativa de la expresión génica del resto de las líneas. Cada valor representa la media \pm SD de dos réplicas biológicas independientes. Las expresiones relativas del gen *phyASr* se calculó de acuerdo con el método de $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Las diferentes letras en las barras indican una diferencia significativa en los niveles de expresión entre las líneas de acuerdo con el ANOVA y la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) ($p \leq 0.05$).

2.4 DISCUSIÓN

Dada la importancia comercial que han alcanzado las fitasas, se han hecho diversos esfuerzos para incrementar la producción de estas enzimas mediante técnicas de ingeniería genética en biorreactores convencionales. Hasta la fecha, solo se conoce un reporte donde se indica el uso del cloroplasto de *C. reinhardtii* como biorreactor para la producción recombinante de una fitasa tipo HAP de *E. coli*. Sin embargo, los rendimientos obtenidos en este trabajo fueron muy bajos (10 U mg^{-1} de microalga) (Yoon *et al.*, 2011).

Por lo tanto, previamente en el laboratorio se obtuvieron líneas transplastómicas usando una construcción de expresión que contiene el gen *phyASr*, que codifica para la fitasa de la bacteria *S. ruminantium*, la cual fue clonada bajo la regulación del P+5'UTR del gen *atpA* y la región 3'UTR del gen *psbA* del cloroplasto de *C. reinhardtii* (Rivera-Solís, 2013). De acuerdo a datos publicados por Barnes y colaboradores (2005), dichas regiones son una de las mejores combinaciones para la acumulación de ARNm.

Por tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar la expresión del ARNm de cinco líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* que presentan el gen *phyASr*. Para ello, primeramente se realizó la extracción de ARN total de dichas líneas junto con la línea silvestre, donde se observó la integridad de los transcritos a través de las bandas ribosomales definidas que se muestran en el apartado anterior.

Posteriormente, se procedió con el análisis de la correcta síntesis de ADNc por RT-PCR de punto final, para ello se utilizó un gen que se encuentra en el genoma del cloroplasto de *C. reinhardtii* y cuya expresión es constitutiva, en este caso fue el gen *rpl16* que codifica para una proteína ribosomal. Se observó que tanto la línea silvestre como las líneas transplastómicas mostraron un solo tamaño de amplicón de 210 pb, indicativo de la expresión de dicho gen en las muestras con retrotranscriptasa (Superscript III). Además, se observó ausencia de contaminación de ADNg en los extractos de ARN total, ya que no se observó amplificación en el control negativo de las muestras sin retrotranscriptasa (RT-).

Después de determinar la calidad de las muestras de ADNc se procedió a determinar la expresión del gen *phyASr* por RT-PCR de punto final. En esta sección se observó que todas las líneas transplastómicas expresaron el gen que codifica a la enzima fitasa

de *S. ruminantium* con un tamaño del amplicón de 246 pb, lo que indica que las secuencias reguladoras utilizadas en la construcción de expresión funcionaron correctamente. El promotor, más el 5' UTR del gen *atpA* y la región 3'UTR del gen *psbA* del cloroplasto de *C. reinhardtii*, han sido sugeridas como unas de las mejores combinaciones para la acumulación de ARNm en esta microalga (Barnes *et al.* 2005). Así mismo, según Rasala y colaboradores (2010), la traducción y la acumulación de ARNm están determinadas principalmente por la selección del promotor y la región reguladora, por lo que son factores críticos a considerar para lograr obtener un alto rendimiento de la proteína de interés.

Una vez observada la expresión del gen *phyASr* por RT-PCR de punto final, se prosiguió con el análisis de los niveles de expresión de dicho gen de manera cuantitativa mediante ensayos de qRT-PCR en las líneas transplásticas de *C. reinhardtii*. Para ello fue muy importante la evaluación de la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos cebadores para el gen de interés *phyASr* y el gen normalizador *rpl16*. Por tanto, se realizó y analizó una curva estándar para cada uno de los cebadores, con la finalidad de determinar la eficiencia, sensibilidad y reproducibilidad del ensayo. Para ello se generaron cinco puntos de la recta por triplicado a partir de diluciones 1:8 para su validación dentro de 12 ciclos de amplificación. Como resultado se obtuvo un coeficiente de correlación (R^2) de 0.988 para los cebadores del gen *rpl16* y 0.993 para los cebadores del gen *phyASr*, lo cual es un indicativo de que estos valores fueron cercanos entre la regresión lineal de la curva estándar y los valores individuales de C_T de las muestras estándar. Así mismo, se obtuvo una pendiente con valores de -3.544 para el gen *rpl16* y -3.474 para el gen *phyASr*, y se sabe que una pendiente cercana a -3.3 indica una eficiencia de amplificación óptima, próxima al 100% (Green y Sambrook, 2012). Por lo tanto, dichos valores de la pendiente coinciden con los obtenidos en la eficiencia de amplificación de 91.49% y 94.03% respectivamente.

Por otra parte, se requirió un análisis post-amplificación mediante una curva de disociación para asegurar la ausencia de productos amplificados inespecíficos. En este caso, se observó que ambas curvas de disociación de cada uno de los cebadores (*rpl16* y *phyASr*) mostraron un solo pico representativo, indicando que se generó un solo amplicón que se disoció a determinada temperatura (T_m). Por lo tanto, se puede considerar que el diseño y concentración de los oligonucleótidos fue óptimo,

resultando en una amplificación altamente específica (Green y Sambrook, 2012).

Existen dos métodos de análisis de datos para experimentos de PCR cuantitativa, los cuales son: la cuantificación absoluta y la cuantificación relativa (Livak y Schmittgen, 2001). Esta última determina los niveles de expresión de un gen de interés a partir de múltiples muestras en comparación a una muestra de referencia o control. Por lo tanto, la cuantificación relativa no requiere estándares con concentraciones conocidas y la muestra de referencia puede ser cualquier transcrito, siempre y cuando se conozca su secuencia. La cuantificación relativa se basa en los niveles de expresión de un gen de interés en comparación con uno o más gen(es) de referencia cuya expresión es constante durante las condiciones del experimento (Pfaffl, 2001). El método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ es el más frecuentemente utilizado para analizar los cambios relativos en la expresión de genes en tiempo real de los experimentos de PCR cuantitativa (Livak y Schmittgen, 2001).

Por otra parte, a través de la cuantificación absoluta se determinan los niveles de expresión en números absolutos de copias en base a una curva de calibración, en el cual las cantidades absolutas de los estándares deben ser conocidas a través de métodos independientes. Como se sabe, las curvas de calibración son altamente reproducibles y permiten la generación de datos altamente específicos y sensibles. Sin embargo, el modelo de una curva de calibración externa tiene que ser validado a fondo como la exactitud de la cuantificación absoluta en tiempo real de RT-PCR, es decir depende enteramente de la exactitud de las normas y en gran medida de las buenas prácticas de laboratorio. Por lo tanto, la cuantificación con estándares externos requiere una cuidadosa optimización de su precisión y reproducibilidad (Pfaffl y Hageleit, 2001).

Por esta razón, se consideró relevante solo determinar los niveles de expresión de los transcritos de interés del gen *phyASr* entre las cinco líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* mediante una cuantificación relativa bajo la detección del colorante fluorescente SYBR Green I. Para el análisis de expresión de dicho gen, las muestras fueron normalizadas mediante la expresión de un gen de referencia endógeno, que en este caso fue el gen *rpl16*, cuya expresión se sabe que es constante en todas las muestras evaluadas. La normalización de las muestras mediante un gen de referencia endógeno proporciona un método de corrección de resultados en caso de alguna variación en la cantidad de ARN adicionado (Livak y Schmittgen, 2001).

Para el cálculo de la expresión relativa del gen *phyASr* se utilizó el método de $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Así mismo, se usó como muestra de referencia (control) la línea 13-1, debido a que fue la clona que presentó menor expresión cuantitativa entre las líneas, y a su vez, permitió una mejor visualización de los datos. Por lo tanto, por definición esta muestra presenta un valor de $2^{-\Delta\Delta C_T}$ igual a 1.0 (Green y Sambrook, 2012; Livak y Schmittgen, 2001). Una vez normalizados los datos, las muestras fueron comparadas con la muestra de referencia, donde se observó que la línea B3-3 tuvo 3 veces mayor expresión que la línea 13-1. Mientras que las líneas 21-1, 25-2 y 29-7 tuvieron aproximadamente 2 veces mayor expresión que la línea 13-1. Sin embargo, las líneas 21-1 y 25-2 no presentaron una diferencia significativa con respecto a la muestra de referencia. Por lo tanto, la línea B3-3 fue la de mayor nivel de expresión relativa en comparación a todas líneas transplastómicas. Debido a que las condiciones de crecimiento de los cultivos fueron iguales entre las líneas, y se comprobó en estudios previos la homoplásmia de éstas, se esperó que las líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* presentaran niveles de expresión similares. No obstante, se piensa que esta diferencia de expresión se deba a lo mencionado por Surzycki y colaboradores (2009) quienes observaron que entre los factores que afectan los niveles de expresión de las proteínas transgénicas, los elementos genéticos como el promotor, las regiones 5' y 3'UTRs o los sitios de inserción, podrían tener un efecto de menor grado. Sin embargo, argumentan que probablemente los niveles de expresión dependen en mayor grado sobre la naturaleza de los cambios que se presentan durante los eventos de transformación individual en las líneas transformadas. Dichos cambios podrían ser resultado de la formación de una línea transformada que ahora presenta características únicas, o sufre una transformación asociada a modificaciones genotípicas, o también denominado transformosomas, lo que provoca una amplia variación en la acumulación de proteínas en las líneas transformadas "genéticamente idénticas" debido a probables cambios durante el proceso de transformación por biobalística o procesos de selección. Por lo tanto, también se esperaría que estos cambios afecten a otras características de las cepas transgénicas, tales como las tasas de crecimiento o la estabilidad de la proteína.

2.5 CONCLUSIONES

1. Las cinco líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* expresaron el gen *phyASr* que codifica a la enzima fitasa de *S. ruminantium* y esta expresión se pudo detectar en un primer paso mediante RT-PCR de punto final.
2. Los oligonucleótidos de los genes *rpl16* y *phyASr* presentaron una alta eficiencia de amplificación cercana al 100%, y una amplificación altamente específica hacia la secuencia de interés, lo que indica que el diseño y la concentración de los cebadores fue óptima.
3. Entre las cinco líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* evaluadas, la línea B3-3 fue la que presentó mayor nivel de expresión relativa del gen *phyASr*.

2.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barnes, D., S. Franklin, J. Schultz, R. Henry, E. Brown, A. Coragliotti, S.P. Mayfield (2005). Regions of plastid mRNAs to the expression of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast genes. *Molecular Genetics and Genomics*. 274, 625 – 636.
- Cheng, K.J., B.L. Selinger, L. J.Yanke., H.D. Bae, L. Zhou y C.W. Forsberg, (1999). Phytases of ruminal microorganisms. US Patent Number: 5, 939, 303.
- Chu, H.M., R.T. Guo, T.W. Lin, C.C. Chou, H.L. Shr, H.L. Lai, T.Y. Tang, K.J. Cheng, B.L. Selinger y A.H.J. Wang (2004). Structures of *Selenomonas ruminantium* phytase in complex with persulfated phytate: DSP phytase fold and mechanism for sequential substrate hydrolysis. *Structure*. 12(11), 2015 – 2024.
- Gorman, D.S. y R.P. Levine (1965). Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 54(6), 1665 – 1669.
- Graf, E. (1986). Phytic acid, chemistry and applications. Pilatus Press: Minneapolis, Minn. pp. 344.
- Green M.R. y J. Sambrook (2012). Quantification of DNA and RNA by Real-Time PCR, in: *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y. pp. 661.
- Hansen, P.J. (2000). Use of a hemocytometer. Department of animal science, University of Florida. 10-15 p.
- Harris, E. (1989). The *Chlamydomonas* sourcebook. Academic New York.
- Howson, S.J. y R.P. Davis (1983). Production of phytate-hydrolysing enzyme by some fungi. *Enzyme Microbial Technology*. 5, 377 – 382.
- Lilly, J.W., J.E. Maul y D.B. Stern (2002). The *Chlamydomonas reinhardtii* organellar genomes respond transcriptionally and posttranscriptionally to abiotic stimuli. *Plant Cell*. 14, 2681 – 2706.
- Livak, K.J. y T.D. Schmittgen (2001). Analyzing of relative gene expression data using
-

real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*. 25, 402 – 408.

Mcmanus, J.F.A. y R. Mowry (1964). *Special Methods for the constituents of cell and tissues in: Staining methods, Histologic and Histochemical*, Harper y Row, Nueva York, Evanston y Londres; John Weatherhill, Inc., Tokyo pp. 186.

Mcmanus, J.F.A. y R.W.L. Mowry (1964). *Staining methods*. Harper and Row, New York.

Merchant, S.S., S.E. Prochnik, O. Vallon, E.H. Harris, S.J. Karpowicz, G.B. Witman, A. Terry, A. Salamov, L.K. Fritz-Laylin, L. Maréchal-Drouard, W.F. Marshall, L.H. Qu, D.R. Nelson, A.A. Sanderfoot, M.H. Spalding, V.V. Kapitonov, Q. Ren, P. Ferris, E. Lindquist, H. Shapiro, S.M. Lucas, J. Grimwood, J. Schmutz, P. Cardol, H. Cerutti, G. Chanfreau, C.L. Chen, V. Cognat, M.T. Croft, R. Dent, S. Dutcher, E. Fernández, H. Fukuzawa, D. González-Ballester, D. González-Halphen, A. Hallmann, M. Hanikenne, M. Hippler, W. Inwood, K. Jabbari, M. Kalanon, R. Kuras, P.A. Lefebvre, S.D. Lemaire, A.V. Lobanov, M. Lohr, A. Manuell, I. Meier, L. Mets, M. Mittag, T. Mittelmeier, J.V. Moroney, J. Moseley, C. Napoli, A.M. Nedelcu, K. Niyogi, S.V. Novoselov, I.T. Paulsen, G. Pazour, S. Purton, J.P. Ral, D. M. Riaño-Pachón, W. Riekhof, L. Rymarquis, M. Schroda, D. Stern, J. Umen, R. Willows, N. Wilson, S.L. Zimmer, J. Allmer, J. Balk, K. Bisova, C.J. Chen, M. Elias, K. Gendler, C. Hauser, M.R. Lamb, H. Ledford, J.C. Long, J. Minagawa, M.D. Page, J. Pan, W. Pootakham, S. Roje, A. Rose, E. Stahlberg, A.M. Terauchi, P. Yang, S. Ball, C. Bowler, C.L. Dieckmann, V.N. Gladyshev, P. Green, R. Jorgensen, S. Mayfield, B. Mueller-Roeber, S. Rajamani, R.T. Sayre, P. Brokstein, I. Dubchak, D. Goodstein, L. Hornick, Y.W. Huang, J. Jhaveri, Y. Luo, D. Martínez, W.C.A. Ngau, B. Otilar, A. Poliakov, A. Porter, L. Szajkowski, G. Werner, K. Zhou, I.V. Grigoriev, D.S. Rokhsar y A.R. Grossman (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*. 318(5848), 245 – 250.

Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29(9).

Pfaffl M.W. y M. Hageleit (2001). Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnology Letters*. 23, 275 – 282.

- Raun, A., E., Cheng y W. Burroughs (1956). Phytate phosphorus hydrolysis and availability to rumen microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 4, 869 – 871.
- Rivera-Solís, R.A. (2013). Caracterización molecular de secuencias homólogas a fosfatasas ácidas púrpura en *Chlamydomonas reinhardtii* y generación de un plásmido recombinante para la expresión de una fitasa en el cloroplasto de esta microalga (tesis de doctorado). Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Yucatan, México.
- Specht, E., S. Miyake-Stoner y S. Mayfield (2010). Micro-algae come of age as a platform for recombinant protein production. *Biotechnology Letters*. 32(10), 1373 – 1383.
- Surzycki R., K. Greenham, K. Kitayama, F. Dibal, R. Wagner, J.D. Rochaix, T. Ajam y S. Surzycki (2009). Factors effecting expression of vaccines in microalgae. *Biologicals*. 37, 133 – 138.
- Yoon, S.M., S. Kim, K. Li, B. Yoon, S. Choe y M. Kuo (2011). Transgenic microalgae expressing *Escherichia coli appA* phytase as feed additive to reduce phytate excretion in the manure of young broiler chicks. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 91(3), 553 – 563.

CAPÍTULO III

3. EFECTO DEL EXTRACTO LIOFILIZADO DE UNA LÍNEA TRANSPLATÓMICA DE *C. reinhardtii* QUE EXPRESA AL GEN *phyASr* SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA LÍNEA SILVESTRE EN PRESENCIA DE IP₆

3.1 INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) es un macronutriente esencial debido a que es un componente estructural clave para diversas moléculas biológicas tales como los ácidos nucleicos, los fosfolípidos, y el ATP, además de estar involucrado en la regulación de diversas vías metabólicas y procesos fisiológicos. Los organismos no pueden crecer sin un suministro fiable de P, el cual es asimilado en forma de ortofosfato (PO₄³⁻) también conocido como fósforo inorgánico (Pi) (Theodorou y Plaxton, 1993).

Se ha reportado que después del nitrógeno (N), el P es el segundo macronutriente más frecuentemente limitado para el crecimiento de las plantas (Theodorou y Plaxton, 1993), por lo que éstas han desarrollado transportadores especializados para la absorción de Pi, y sistemas de flujo que participan en la redistribución del P del suelo cuando éste no se encuentra disponible (Schachtman *et al.*, 1998).

Chlamydomonas reinhardtii presenta un conjunto de respuestas específicas que le permiten adaptarse a las condiciones de limitación de P, mientras redistribuye las reservas de P internas. Entre estas respuestas se encuentra la movilización del polifosfato almacenado, así como el ADN plastídico y el reemplazo de los fosfolípidos por galactolípidos y sulfolípidos (Werner *et al.*, 2007; Yehudai-Resheff *et al.*, 2007; Riekhof *et al.*, 2003).

Se ha reportado que la mayor parte del Pi absorbido por *C. reinhardtii* suele acumularse como cuerpos de polifosfato (Hebeler *et al.*, 1992). Además, esta microalga posee vacuolas densas que contienen grandes cantidades de pirofosfato (PPi) y cadenas de polifosfato, los cuales sirven como formas de almacenamiento de Pi (Ruiz *et al.*, 2001; Siderius *et al.*, 1996).

Se sabe que bajo la limitación de P, *C. reinhardtii* es capaz de sintetizar diversas fosfatasas que pudieran permitir el aprovechamiento de P del ambiente (Quisel *et al.*, 1996, Patni *et al.*, 1977; Matagne *et al.*, 1976). Sin embargo, ninguna de ellas ha sido caracterizada.

Quisel y colaboradores (1996) mencionaron que ante condiciones de déficit de P, se indujo la producción de fosfatasas alcalinas en *C. reinhardtii*, las cuales no resultaron catalíticamente eficientes cuando usaron al fitato (IP_6) como sustrato. Sin embargo, estos autores comentaron la observación de que *C. reinhardtii* fue capaz de crecer en un medio de cultivo suplementado con IP_6 como la única fuente de P (datos no publicados), por lo que sugirieron la existencia de alguna enzima tipo fitasa que aún no ha sido identificada en esta microalga.

Por su parte, el grupo de trabajo de nuestro laboratorio realizó la caracterización *in silico* y el análisis de expresión de seis genes homólogos a genes que codifican para fosfatasas de la clase PAP (fosfatasas ácidas púrpura) en *C. reinhardtii* (*CrPAP1-6*), la cual fue cultivada en diferentes tratamientos con IP_6 en presencia o ausencia de P (Rivera-Solís *et al.*, 2013). En este trabajo se observó una expresión constitutiva de los genes *CrPAP2*, *CrPAP3*, *CrPAP4* y *CrPAP6* en todos los medios evaluados, mientras que los genes *CrPAP1* y *CrPAP5* fueron inducidos por la adición de IP_6 a un medio sin sales de P. A pesar de que el estudio de las fosfatasas es muy limitado en microalgas, y ninguna PAP con o sin actividad fitasa ha sido identificada, los resultados de este estudio presentaron la evidencia de que *C. reinhardtii* fue capaz de crecer en un medio suplementado exclusivamente con IP_6 como la única fuente de P, además de proporcionar un punto de partida para elucidar el potencial de las PAPs en la hidrólisis del IP_6 en *C. reinhardtii*, por lo que se sugirió que esta microalga presenta al menos una fitasa endógena aún por ser caracterizada.

Por otra parte, *C. reinhardtii* sería un vehículo ideal para producir fitasas recombinantes que pudieran ser suministradas directamente en el alimento de los animales monogástricos, y ya se ha comenzado a realizar trabajos al respecto. Tal es el caso de Yoon y colaboradores (2011) que proporcionaron la primera evidencia de la expresión funcional de una fitasa microbiana en *C. reinhardtii*, y demostraron el concepto del uso de microalgas transgénicas como aditivo alimenticio para la entrega de enzimas dietéticas sin necesidad de la purificación de proteínas. Para ello realizaron un proceso de lisis a una pasta celular transgénica por congelación en nitrógeno líquido, seguido de su descongelación a temperatura ambiente y por último su liofilización. Este preparado liofilizado lo denominaron como “clasato”, y fue adicionado como suplemento a la dieta de pollos de engorda, observando una reducción del 43% en la excreción de IP_6 en las heces, y un aumento en la liberación de Pi de un 41%, en comparación con las de los pollos alimentados sólo con la dieta

basal.

Por esta razón, es importante continuar con la caracterización de las líneas transplastómicas disponibles en nuestro grupo de trabajo, y como para parte de esta caracterización, en este capítulo el objetivo fue evaluar indirectamente, si la fitasa recombinante encontrada en extractos protéicos de al menos una de las líneas transplastómicas es capaz de mejorar el crecimiento de la línea silvestre en un medio de cultivo con IP₆ como única fuente de P.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Cepa de *C. reinhardtii* y condiciones de cultivo

Los cultivos utilizados fueron cinco cepas transplastómicas de *C. reinhardtii* que contienen el gen *phyASr* de la bacteria ruminal *Selenomonas ruminantium*. Dichas líneas tienen como nomenclatura: 13-1 (línea 1), 21-1 (línea 2), 25-2 (línea 3), 29-7 (línea 4) y B3-3 (línea 5); éstas fueron proporcionadas por la I.B.Q. Shirley Bernardo Candelero del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). También se utilizó la cepa silvestre de *C. reinhardtii* CC-125 (mt+) donada por la Dra. Elizabeth Harris del Centro de *Chlamydomonas reinhardtii* (Universidad de Duke, Durham, Carolina del Norte. EUA; www.chlamy.org) y actualmente depositada en el laboratorio BT04 de la Unidad de Biotecnología del CICY.

El mantenimiento de los cultivos se realizó de manera axénica en medio Tris-Acetato-Fosfato (TAP) pH 7.0 (Gorman y Levine, 1965) a 25 ± 2 °C, bajo un fotoperiodo de 16 h:8 h (luz:oscuridad) con una intensidad lumínica de $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proveniente de lámparas MAGG F54T5/6500 K, en un orbitador a 140 rpm (Thermo Scientific, modelo MAXQ 4450) (Lilly *et al.* 2002). El periodo de incubación de los cultivos fue de 7 días. En el caso de las cepas transplastómicas, éstas fueron cultivadas en 50 mL de medio TAP (Harris, 1989) conteniendo 50 μL de espectimonicina (100 mg/mL) en un matraz de 250 mL, mientras que la cepa silvestre, fue cultivada en 50 mL de medio TAP sin antibiótico en un matraz de 250 mL.

3.2.2 Comparación del crecimiento de las líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* bajo diferentes medios con P.

La comparación del crecimiento de las líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* se realizó en presencia del IP₆ (sal de fitato de sodio hidratado, Sigma P8810) como única

fuente de P. Para ello, se utilizaron dos medios de cultivo: 1) TAP (Gorman y Levine, 1965) y 2) TA+IP₆ (sin sales de P aportadas por el TAP, más 171 µM de IP₆) (Rivera-Solís *et al.*, 2013). Ambos tratamientos fueron ajustados a pH 7.0. Se utilizó como control la línea silvestre de *C. reinhardtii*.

Previamente, se realizó un precultivo inoculando una colonia de cada línea de *C. reinhardtii* en 50 mL de medio TAP, y se colectó al séptimo día de cultivo, al final de la fase exponencial de crecimiento. Posteriormente, se realizaron tres lavados con medio TA para eliminar las trazas de P que pudieran quedar. Para el lavado se recuperó el contenido celular del precultivo por medio de centrifugación a 4,216 rpm a 4 °C durante cinco minutos, el sobrenadante fue desechado y la pastilla celular fue resuspendida con 50 mL de medio TA. Este proceso se repitió dos veces más, y de la última resuspensión, se tomó una alícuota para inocular a una concentración final de 10, 000 células mL⁻¹ en 10 mL del medio correspondiente contenido en un tubo Falcon de 50 mL, nuevo y estéril, el cual se dejó cultivando durante siete días.

3.2.2.1 *Conteo celular de los cultivos de C. reinhardtii y peso de la biomasa seca.*

Al finalizar el séptimo día de crecimiento, se tomaron alícuotas de los cultivos para calcular el número de células por mililitro (cel/mL) de cada una de las líneas transplastómicas y de la línea silvestre de *C. reinhardtii*, en el cual se utilizó una cámara de Neubauer (hemocitómetro), siguiendo el procedimiento ya mencionado en el apartado de materiales y métodos del capítulo II.

Para la determinación de la biomasa seca, se concentraron los 9 ml de cultivo restante en tubos tipo Eppendorf por centrifugación a 3,000 rpm por cinco minutos a 25 °C. Posteriormente las muestras se congelaron en Nitrógeno líquido y se liofilizaron por 48 horas. Una vez obtenida la biomasa liofilizada se realizó la determinación de la acumulación de la biomasa por peso seco usando una balanza analítica OHAUS.

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante una prueba de ANOVA de una vía con una prueba de Fisher LSD para determinar diferencias significativas entre tratamientos. Para ello se utilizó el paquete estadístico STATGRAPHICS Plus para Windows versión 4.1 (<http://www.statgraphics.com>). Todos los reactivos y solventes usados fueron de grado analítico. Una vez obtenidos los resultados, se seleccionó la línea transplastómica con mayor concentración celular, la cual fue considerada para el siguiente estudio.

La estrategia experimental que se siguió se presenta en la Figura 3.1.

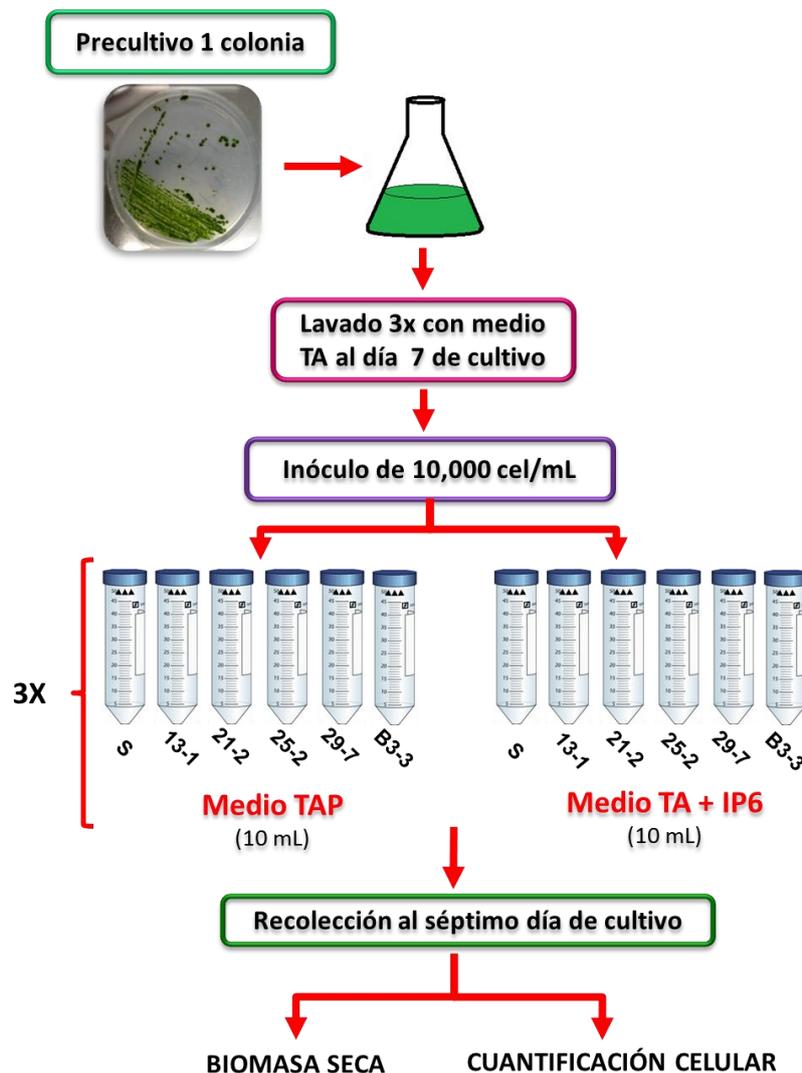


Figura 3.1 Estrategia experimental para la comparación fenotípica de crecimiento de las líneas transplastómicas de *C. reinhardtii*.

A continuación se describen los detalles de cada tratamiento:

1) Tratamiento TAP.

Este tratamiento consistió en cultivar las células de *C. reinhardtii* en medio TAP (Gorman y Levine, 1965). El P fue proporcionado por las sales de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) y fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) que forman parte de la solución denominada amortiguador de fosfatos II (BPII) y cuyo contenido total de P es de 3.19 g por cada 100 mL equivalentes a una concentración de 1 M de P. La

concentración final del P en el medio TAP fue de 1 mM.

2) Tratamiento TA+IP₆.

Este tratamiento consistió de IP₆ como única fuente de P y se realizó empleando un medio de cultivo donde todas las sales de P aportadas por el BPII del medio TAP fueron eliminadas y en su lugar se añadió la cantidad proporcional de P a partir de una solución de IP₆. Dicha solución se preparó pesando 11.33 g de IP₆ en un volumen final de 100 mL, quedando una concentración final de 171 mM de IP₆, la cual aporta la misma cantidad de P que el BPII descrito en el párrafo anterior. A partir de la solución de IP₆ se toman 10 µL los cuales se añaden a 10 mL del medio TA para tener una concentración final de 171 µM de IP₆.

El IP₆ fue agregado a los tratamientos justo antes del inóculo. La solución de IP₆ fue esterilizada por filtración.

3.2.3 Obtención del extracto liofilizado de la línea transplastómica seleccionada

Una vez seleccionada la línea transplastómica de *C. reinhardtii* con mayor concentración celular, se generó un extracto liofilizado de esta línea para determinar su efecto sobre el crecimiento de la línea silvestre de dicha microalga en presencia de IP₆ (sal de fitato de sodio hidratado, Sigma P8810) como única fuente de P.

Previamente se realizó un precultivo inoculando una colonia de la cepa silvestre en 50 mL de medio TAP, y una colonia de la cepa transplastómica en 50 mL de medio TAP adicionado con 50 µL de espectinomicina (100 mg/mL). Ambos precultivos fueron ajustados a pH 7.0 y se mantuvieron bajo las condiciones mencionadas en el apartado 3.2.1.

Posteriormente, al séptimo día de crecimiento se realizó el conteo celular de los precultivos para la posterior inoculación de los cultivos requeridos para la obtención de los extractos liofilizados de ambas líneas. Para ello se realizó una inoculación de 10,000 células mL⁻¹ en ocho matraces conteniendo 50 mL de medio TAP para la línea silvestre, y ocho matraces conteniendo 50 mL de medio TAP adicionados con 50 µL de espectinomicina (100 mg/mL) para la línea transplastómica. Todos los cultivos fueron ajustados a pH 7.0 y se dejaron incubando por siete días bajo las condiciones mencionadas anteriormente. Fue necesario obtener un extracto de la línea silvestre como control negativo para el siguiente experimento (apartado 3.2.4).

Al finalizar el periodo de crecimiento al séptimo día, se colectaron los 50 mL de cada cultivo en un tubo Falcon de 50 mL, nuevo y estéril, el cual fue centrifugado a 4,216 rpm a 4 °C durante cinco minutos. Después se desechó el sobrenadante y se colectaron los siguientes 50 mL de cada cultivo, por lo tanto, este proceso se realizó siete veces más hasta coleccionar los 400 mL de cultivo total de cada línea, obteniendo una pastilla celular de aproximadamente 3 mL.

Posteriormente al finalizar la colecta de los cultivos se llevó a cabo el proceso de lisis celular en base a la metodología de Yoon y colaboradores (2011), donde se le realizó un lavado a cada pastilla celular con una solución de glicerol al 1%, seguido de una centrifugación a 4,216 rpm a 4°C durante 30 minutos. Después se retiró el sobrenadante, y las pastillas celulares obtenidas fueron congeladas en Nitrógeno líquido, seguido de su completa descongelación a temperatura ambiente. Después, las pastillas celulares fueron congeladas de nuevo en Nitrógeno líquido para su liofilización por 48 horas.

Posteriormente, al obtener ambas pastillas celulares completamente liofilizadas se llevó a cabo el proceso de resuspensión. En el caso de la pastilla de la línea silvestre se le adicionó 594 µL de H₂O desionizada y 6 µL de Tween 20, mientras que al de la línea transplástica se le adicionó 1, 980 µL de H₂O desionizada y 20 µL de Tween 20. La diferencia en el volumen de resuspensión se debió a la variabilidad en la cantidad y consistencia de cada pastilla celular después del proceso de liofilización, por lo tanto, dicho volumen fue el necesario para la completa solubilidad de cada pastilla.

Una vez resuspendidas las pastillas celulares se realizó su esterilización por filtración a través de una membrana con un tamaño de poro de 0.22 µm (Millex® -GS, Syringe Filter Unit). No obstante, Cheng y colaboradores (1999) reportaron que la localización de la actividad fitasa de la proteína *phyASr* de la bacteria *S. ruminantium* está asociada a la superficie de la membrana celular externa, por lo tanto, es probable que ocurra una gran pérdida de la actividad de la proteína recombinante durante el proceso de esterilización, por lo que se decidió tomar una alícuota del extracto de la línea silvestre y de la línea transplástica sin esterilizar, para determinar su efecto, junto con los extractos estériles, sobre el crecimiento de la línea silvestre de *C. reinhardtii* en un medio suplementado con IP₆.

3.2.4 Efecto del extracto liofilizado de la línea transplastómica de *C. reinhardtii* sobre el crecimiento de la línea silvestre de dicha microalga en presencia de IP₆

Una vez obtenidos los extractos, se prosiguió con la evaluación del efecto del extracto de la línea transplastómica de *C. reinhardtii* sobre el crecimiento de la línea silvestre de dicha microalga en presencia de IP₆ (sal de fitato de sodio hidratado, Sigma P8810) como única fuente de P. En el estudio se utilizaron dos medios de cultivo: 1) TAP (Gorman y Levine, 1965) y 2) TA+IP₆ (sin sales de P aportadas por el TAP, más 171 μM de IP₆) (Rivera-Solís *et al.*, 2013). Los medios fueron ajustados a pH 7.0.

Previamente se realizó un precultivo inoculando una colonia de la cepa silvestre de *C. reinhardtii* en 50 mL de medio TAP, y se colectó al séptimo día de crecimiento en un tubo Falcon de 50 mL, nuevo y estéril, el cual se centrifugó a 4,216 rpm a 4 °C durante cinco minutos. Después se retiró el sobrenadante y se realizaron tres lavados con medio TA para eliminar las trazas de P que pudieran quedar. Para el lavado se recuperó el contenido celular del precultivo por medio de centrifugación a 4,216 rpm a 4°C durante cinco minutos, el sobrenadante fue desechado y la pastilla celular fue resuspendida con 50 mL de medio TA. Este proceso se repitió dos veces más, y de la última resuspensión, se tomó una alícuota para inocular a una concentración final de 10,000 células mL⁻¹ en 10 mL del medio correspondiente contenido en un tubo Falcon de 50 mL, nuevo y estéril, seguido de la adición de 10 μL del extracto, estéril y no estéril, tanto de la línea silvestre como el de la línea transplastómica de *C. reinhardtii*. Los tratamientos se dejaron cultivando durante siete días bajo las condiciones mencionadas en el apartado 3.2.1.

3.2.4.1 Conteo celular de los cultivos de *C. reinhardtii* y peso de la biomasa seca

Al finalizar el séptimo día de crecimiento, se tomaron alícuotas de cada uno de los cultivos para calcular el número de células por mililitro (cel/mL) de la línea silvestre de *C. reinhardtii*, en el cual se utilizó una cámara de Neubauer (hemocitómetro) siguiendo el procedimiento ya mencionado en el apartado de materiales y métodos del capítulo II.

Para la determinación de la biomasa seca, se concentraron los 9 mL de cultivo restante en tubos tipo Eppendorf por centrifugación a 3,000 rpm por cinco minutos a 25 °C. Posteriormente las muestras se congelaron en Nitrógeno líquido y se liofilizaron por 48 horas; una vez obtenida la biomasa liofilizada se realizó la determinación de la

acumulación de la biomasa por peso seco usando una balanza analítica OHAUS.

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante una prueba de ANOVA de una vía con una prueba de Fisher LSD para determinar diferencias significativas entre tratamientos, para ello se utilizó el paquete estadístico STATGRAPHICS Plus para Windows versión 4.1 (<http://www.statgraphics.com>). Todos los reactivos y solventes usados fueron de grado analítico.

La Figura 3.2 describe la estrategia experimental que corresponde para el apartado 3.2.3 y 3.2.4.

A continuación se describen los detalles de cada tratamiento:

1) Tratamiento TAP (control).

Este tratamiento consistió en cultivar las células de *C. reinhardtii* en medio TAP (Gorman y Levine, 1965). El P fue proporcionado por las sales de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) y fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) que forman parte de la solución denominada amortiguador de fosfatos II (BP II) y cuyo contenido total de P es de 3.19 g por cada 100 mL equivalentes a una concentración de 1 M de P. La concentración final del P en el medio TAP fue de 1 mM.

2) Tratamiento TA+IP₆.

Este tratamiento consistió de IP₆ como única fuente de P y se realizó empleando un medio de cultivo donde todas las sales de P aportadas por el BP II del medio TAP fueron eliminadas y en su lugar se añadió la cantidad proporcional de P a partir de una solución de IP₆. Dicha solución se preparó pesando 11.33 g de IP₆ en un volumen final de 100 mL, quedando una concentración final de 171 mM de IP₆, la cual aporta la misma cantidad de P que el BP II descrito en el párrafo anterior. A partir de la solución de IP₆ se toman 10 µL los cuales se añaden a 10 mL del medio TA para tener una concentración final de 171 µM de IP₆.

El IP₆ fue agregado a los tratamientos justo antes del inóculo. La solución de IP₆ fue esterilizada por filtración.

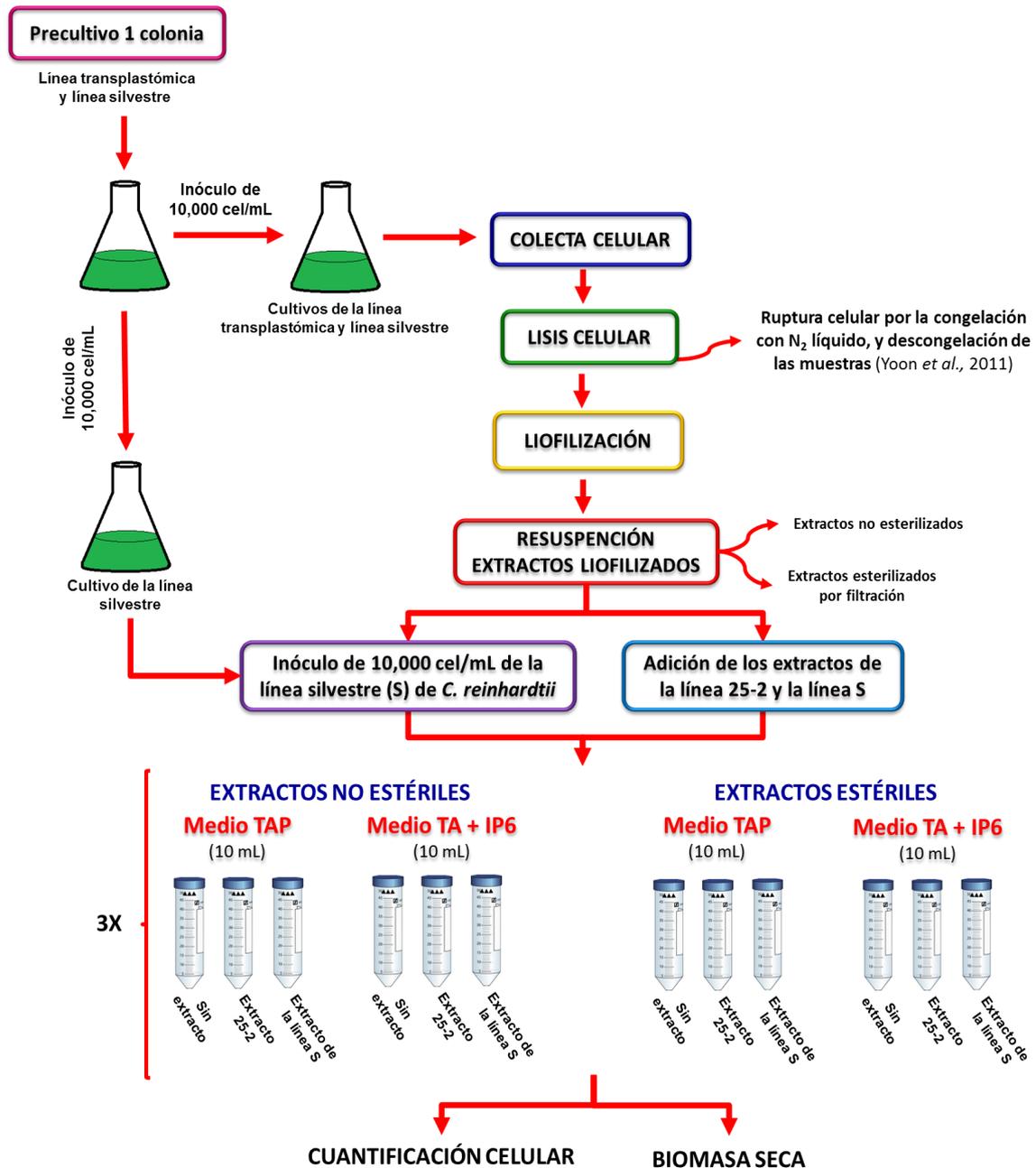


Figura 3.2 Estrategia experimental para determinar el efecto del extracto liofilizado de una línea transplastómica sobre el crecimiento de la línea silvestre de *C. reinhardtii* en presencia de IP₆ como única fuente de P.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Comparación fenotípica de crecimiento de las líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* en diferentes medios con P

En la Figura 3.3B se observó cualitativamente por microscopía óptica a 40X, una morfología celular típica de los cultivos de *C. reinhardtii* al ser cultivados en medio TAP, en el cual todas las líneas transplastómicas y la línea silvestre de dicha microalga, presentaron una forma ovoide y uniforme, con un cloroplasto basal que le da una coloración verde al interior de la célula. No obstante, en el caso de las líneas transplastómicas 21-1 y 25-2, las células presentaron un tamaño relativamente menor (observación cualitativa) y un aglomerado celular característico.

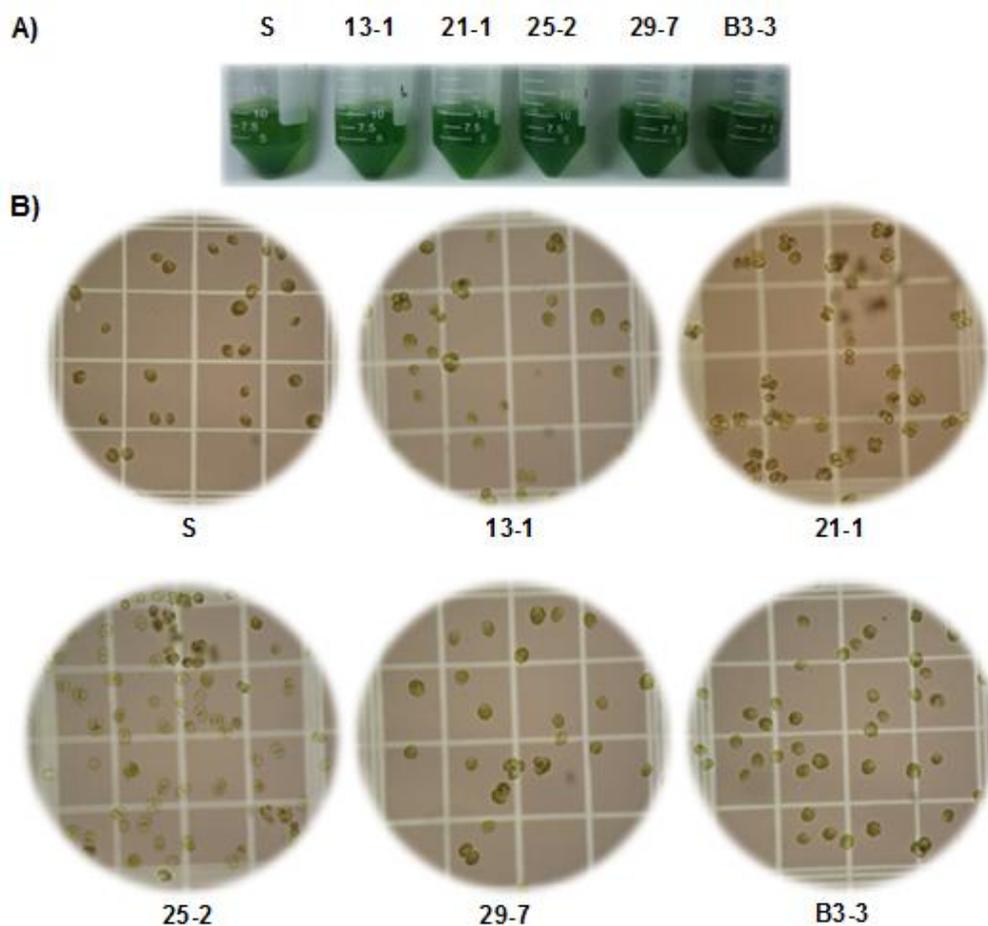


Figura 3.3 A) Cultivos de las líneas transplastómicas y la línea silvestre (S) de *C. reinhardtii* al séptimo día de crecimiento en tubos Falcon conteniendo de 10 mL de medio TAP. B) Visualización de los cultivos de las líneas transplastómicas y la línea S de *C. reinhardtii* al séptimo día de crecimiento por microscopía óptica a un objetivo 40X.

Mientras tanto, en la Figura 3.4B se observó que los cultivos presentaron una morfología diferente cuando fueron cultivados en medio TA suplementado con IP₆ sin sales de P (TA+IP₆), en el cual todas las líneas transplastómicas de *C. reinhardtii*, y la línea silvestre, presentaron una forma celular irregular y una coloración menos intensa comparado con el control. Este último patrón se puede observar en la Figura 3.4A, en el cual todos los cultivos mostraron una coloración verde claro o amarillo. No obstante, a pesar de las características observadas, se demostró que la línea silvestre y las líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* fueron capaces de crecer en medio con IP₆ como única fuente de P.

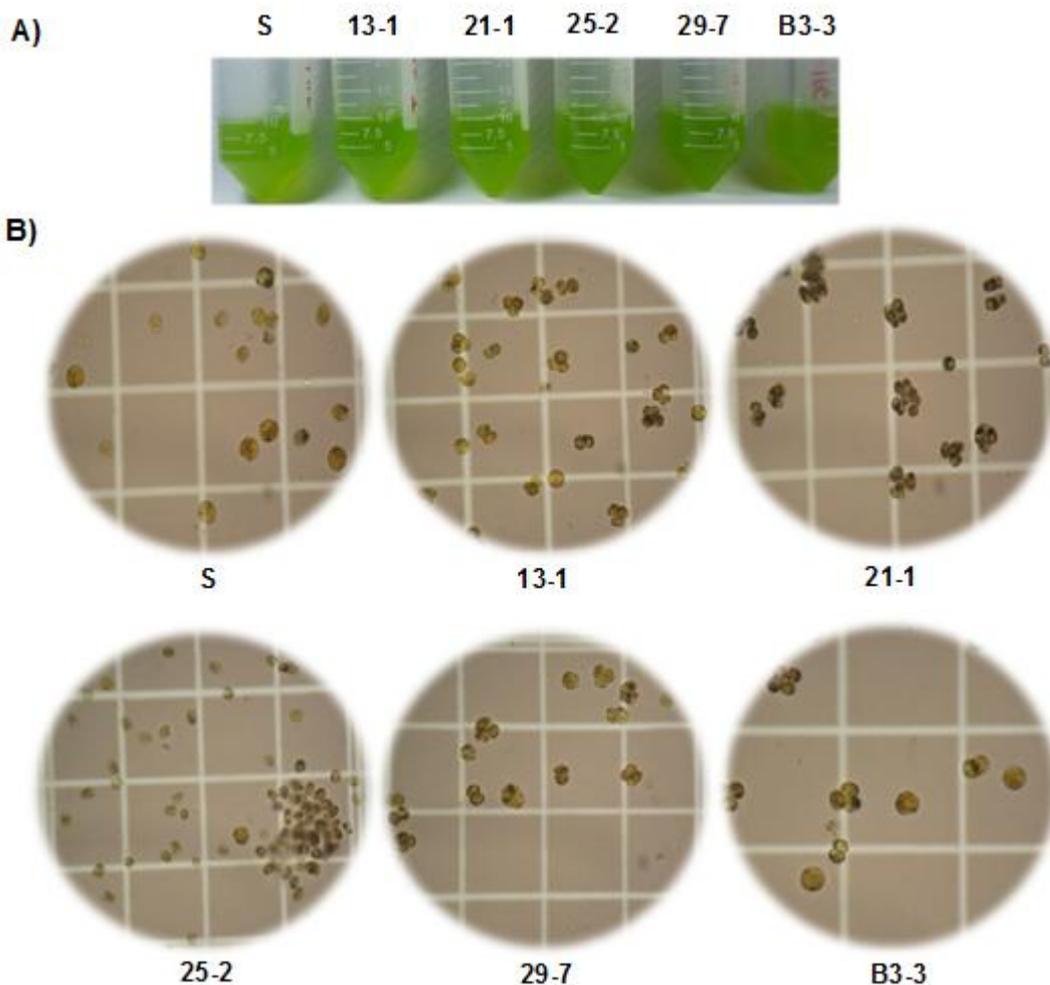


Figura 3.4 A) Cultivos de las líneas transplastómicas y la línea silvestre (S) de *C. reinhardtii* al séptimo día de crecimiento en tubos Falcon conteniendo 10 mL de medio TA+IP₆. B) Visualización de los cultivos de las líneas transplastómicas y la línea S de *C. reinhardtii* al séptimo día de crecimiento por microscopía óptica a un objetivo 40X.

En la Figura 3.5A se presentan los resultados del número de células y acumulación de

biomasa seca, en la cual se observa que la línea silvestre de *C. reinhardtii* presentó una baja concentración celular al ser cultivada en medio TA+IP₆ ($4.40 \pm 0.30 \times 10^6$ células mL⁻¹) en comparación con el medio TAP ($8.86 \pm 0.96 \times 10^6$ células mL⁻¹). La línea 25-2 fue la de mayor concentración celular entre las líneas transplastómicas en ambos tratamientos, alcanzando una concentración de $12.56 \pm 1.19 \times 10^6$ células mL⁻¹ en medio TAP, y una concentración de $10.65 \pm 0.33 \times 10^6$ células mL⁻¹ en medio TA+IP₆. Por lo tanto, esta línea transplastómica se seleccionó para obtener el extracto liofilizado a utilizar posteriormente, como se describe en el apartado 3.2.4. Por otro lado, en la Figura 3.5B se observa que en medio TAP y medio TA+IP₆, la línea B3-3 fue la de mayor peso de biomasa seca (PBS) entre las líneas transplastómicas y la línea silvestre (control), con 6.93 ± 0.30 g y 6.03 ± 0.28 g, respectivamente. No obstante, dicha línea transplastómica presentó una menor concentración celular en comparación a la línea 25-2 en ambos tratamientos: TAP con $8.80 \pm 1.09 \times 10^6$ células mL⁻¹ y TA+IP₆ con $6.88 \pm 1.11 \times 10^6$ células mL⁻¹. Al comparar la Figura 3.5A y 3.5B, no se observó una relación directamente proporcional entre la concentración celular y el PBS de los cultivos.

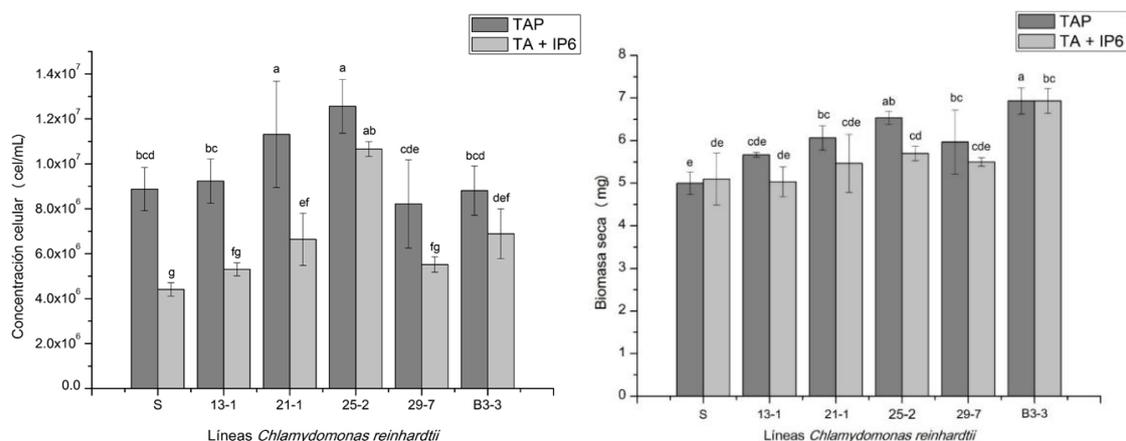


Figura 3.5 A) Concentración celular y B) biomasa seca de las líneas transplastómicas y línea silvestre (S) de *C. reinhardtii* al ser cultivadas en medio TAP y TA+IP₆.

3.3.2 Efecto del extracto liofilizado de la línea transplastómica 25-2 de *C. reinhardtii* sobre el crecimiento de la línea silvestre de dicha microalga en presencia de IP₆

Como se mencionó anteriormente, entre las líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* la línea 25-2 fue la que presentó mayor concentración celular, por lo tanto, fue la cepa seleccionada para la obtención de un extracto liofilizado para, posteriormente, evaluar

su efecto sobre el crecimiento de la línea silvestre de dicha microalga en presencia de IP₆ como única fuente de P. También se consideró obtener un extracto liofilizado de la cepa silvestre de *C. reinhardtii* como un control negativo. En el apartado de materiales y métodos se mencionó que fue necesario evaluar el efecto del extracto liofilizado estéril y no estéril de línea transplastómica 25-2 (además del extracto de la línea silvestre), debido a la posible pérdida de la actividad de la proteína fitasa recombinante al realizar el proceso de esterilización por filtración.

En la Figura 3.6 se muestra por microscopía óptica a 40X los cultivos de la línea silvestre de *C. reinhardtii* en medio TAP y medio TA+IP₆, los cuales fueron adicionados con el extracto de la línea 25-2 o con el extracto de la línea silvestre en condiciones no estériles. Como control negativo, no se adicionó un extracto celular en los tratamientos. Dichos cultivos tuvieron una morfología celular similar a los observados en el apartado anterior (3.3.1), presentando en medio TAP, una forma ovoide y una coloración verde característica al interior de la célula; mientras que en medio TA+IP₆, la mayoría de las células presentaron una pared celular irregular y una coloración verde claro o amarillo. Además, en esta figura también se observó una ligera contaminación bacteriana en los cultivos que se les adicionó el extracto de la línea 25-2 o el de la línea silvestre. Dicho resultado fue lo esperado debido a que fueron los extractos no esterilizados.

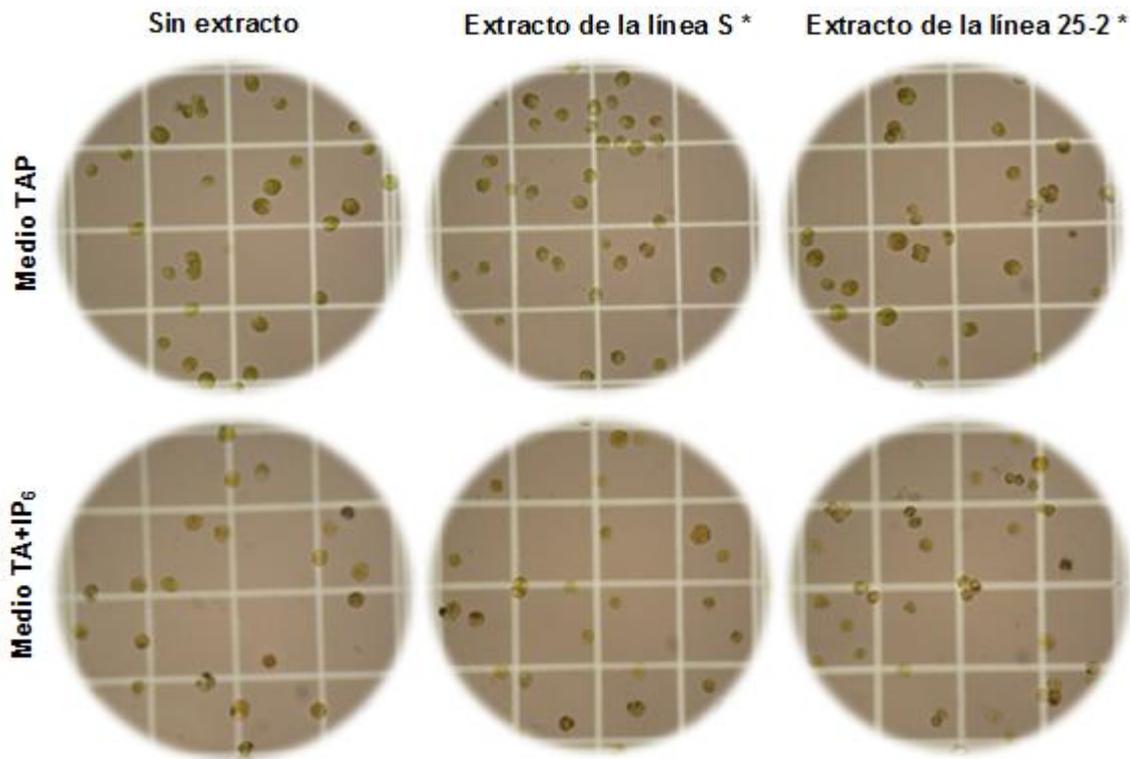


Figura 3.6 Visualización por microscopía óptica (40X) de los cultivos de la línea silvestre de *C. reinhardtii* al adicionar el extracto de la línea silvestre (S) y la línea transplastómica 25-2 en medio TAP y medio TA+IP₆. (*) Extracto no estéril.

En la Figura 3.7 se presentan los resultados del efecto de la adición del extracto no estéril de la línea 25-2 sobre la concentración celular y la acumulación de biomasa seca de la línea silvestre de *C. reinhardtii*. Como se puede observar en la Figura 3.7A, el cultivo sin extracto en medio TAP alcanzó un valor de $6.60 \pm 0.62 \times 10^6$ células mL⁻¹, el cual es significativamente mayor al cultivo sin extracto y con IP₆ como única fuente de P ($5.11 \pm 1.03 \times 10^6$ células mL⁻¹). Así mismo, se puede observar que al adicionar al cultivo el extracto de la línea silvestre en medio TAP alcanzó un valor de $8.15 \pm 0.79 \times 10^6$ células mL⁻¹, el cual es también significativamente mayor que al adicionar este extracto al cultivo con IP₆ ($6.43 \pm 0.64 \times 10^6$ células mL⁻¹). Por otra parte, se puede observar que al adicionar al cultivo el extracto de la línea 25-2 en medio TAP alcanzó un valor de $7.60 \pm 0.67 \times 10^6$ células mL⁻¹, el cual es significativamente menor que al adicionar dicho extracto al cultivo con IP₆ con un valor de $8.42 \pm 1.08 \times 10^6$ células mL⁻¹.

Por lo tanto, existe un aumento significativo en el crecimiento de la línea silvestre de *C. reinhardtii* al adicionar el extracto no estéril de la línea 25-2 en medio TA+IP₆ que en

medio TAP. Así mismo, se observó un aumento significativo en la concentración celular de la línea silvestre de *C. reinhardtii* al adicionar en medio TA+IP₆ el extracto no estéril de la línea 25-2, en comparación con la adición del extracto no estéril de la línea silvestre, o al no adicionar un extracto.

Por otra parte, al adicionar el extracto no estéril de la línea silvestre, resultó en una menor concentración celular de la microalga en medio TA+IP₆ que en medio TAP. Resultados similares se obtuvieron al no adicionar un extracto en ambos tratamientos. No obstante, hubo una mayor concentración celular de la microalga al adicionar en el medio TA+IP₆ el extracto no estéril de la línea silvestre que al no adicionar un extracto.

Con respecto a la acumulación de biomasa seca, en la Figura 3.7B se puede observar que el cultivo sin extracto en medio TAP tuvo un valor de 5.93 ± 0.42 g, el cual es significativamente mayor que al del cultivo sin extracto y con IP₆ (4.46 ± 0.20 g). Por otro lado, al adicionar al cultivo el extracto de la línea silvestre en medio TAP se obtuvo una biomasa seca de 5.63 ± 0.15 g, el cual no tuvo una diferencia significativa con el valor obtenido al adicionar dicho extracto al cultivo con IP₆ (5.43 ± 0.21 g). Así mismo, al adicionar al cultivo el extracto de la línea 25-2 en medio TAP se obtuvo un valor de 6.10 ± 0.26 g, el cual es mayor, pero no con una diferencia significativa, con el valor obtenido al adicionar este extracto al cultivo con IP₆ (5.46 ± 0.31 g).

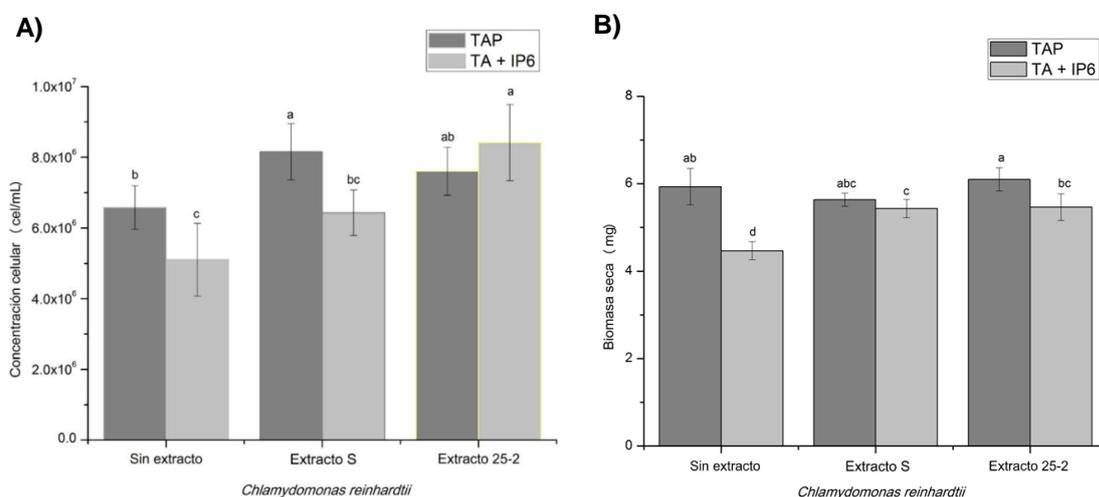


Figura 3.7 A) Concentración celular y B) biomasa seca de la línea silvestre de *C. reinhardtii* al evaluar el efecto del extracto no estéril de la línea transplastómica 25-2 y de la línea silvestre (S) de dicha microalga en medio TAP y medio TA+IP₆.

A continuación se reportan los resultados obtenidos al evaluar el efecto de los extractos estériles sobre el crecimiento de la línea silvestre de *C. reinhardtii* en presencia de IP₆. En la Figura 3.8 se puede muestra por microscopía óptica a 40X los cultivos de la línea silvestre de *C. reinhardtii* en medio TAP y medio TA+IP₆, los cuales fueron adicionados con el extracto de la línea 25-2 o con el extracto de la línea silvestre. Como control negativo, no se adicionó ningún extracto en ambos tratamientos. Dichos cultivos tuvieron una morfología celular similar a los que se les adicionó los extractos no estériles, sin embargo, en este caso no hubo contaminación bacteriana.

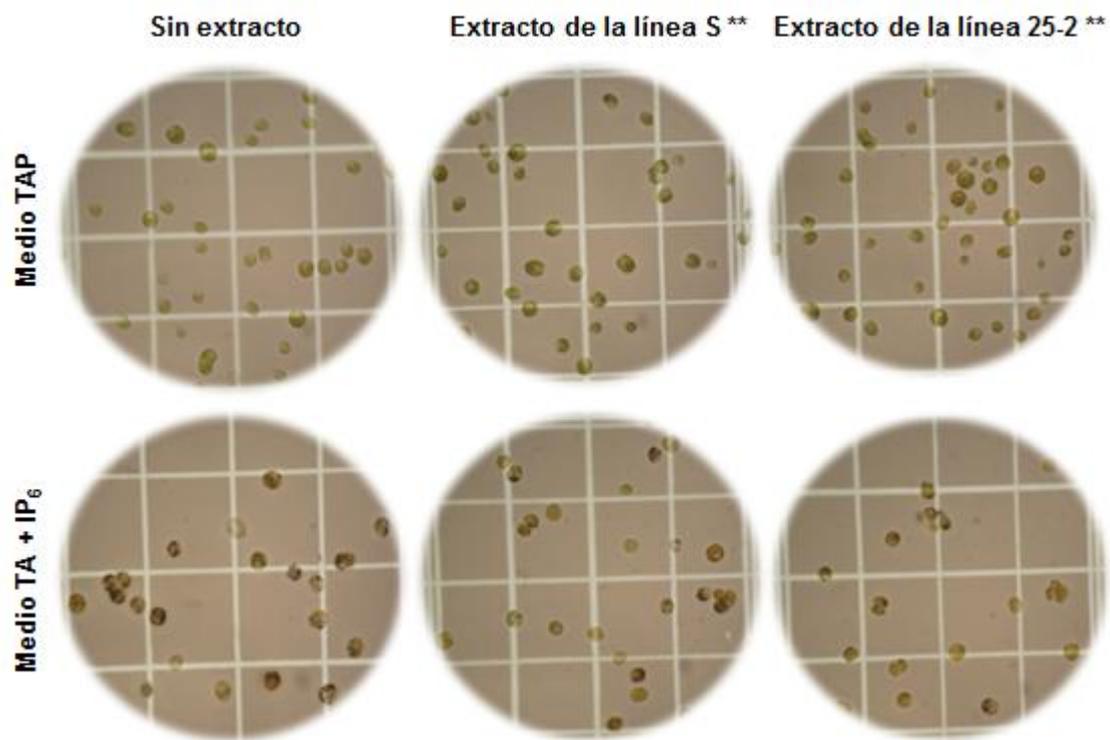


Figura 3.8 Visualización por microscopía óptica (40X) de los cultivos de la línea silvestre de *C. reinhardtii* al adicionar el extracto de la línea silvestre (S) y la línea transplastómica 25-2 en medio TAP y medio TA+IP₆. () Extracto estéril.**

En la Figura 3.9 se presentan los resultados del efecto de la adición del extracto estéril de la línea 25-2 sobre la concentración celular y la acumulación de biomasa seca de la línea silvestre de *C. reinhardtii*. Como se puede observar en la Figura 3.9A, el cultivo sin extracto en medio TAP alcanzó un valor de $8.02 \pm 0.69 \times 10^6$ células mL⁻¹, el cual fue significativamente mayor en comparación al cultivo sin extracto y con IP₆ ($6.47 \pm 0.79 \times 10^6$ células mL⁻¹). Por otra parte, se puede observar que al adicionar al cultivo el extracto de la línea silvestre en medio TAP alcanzó un valor de $7.56 \pm 0.79 \times 10^6$

células mL⁻¹, el cual no tuvo una diferencia significativa al adicionar este extracto en medio TA+IP₆ ($6.09 \pm 0.37 \times 10^6$ células mL⁻¹). En cambio, al adicionar al cultivo el extracto de la línea 25-2 en medio TAP se obtuvo una concentración de $7.65 \pm 0.33 \times 10^6$ células mL⁻¹, el cual fue mayor, pero sin una diferencia significativa, al valor obtenido al adicionar dicho extracto en medio TA+IP₆ ($6.53 \pm 0.44 \times 10^6$ células mL⁻¹).

Por lo tanto, se concluye que no hubo un efecto significativo en el crecimiento de la línea silvestre de *C. reinhardtii* al adicionar el extracto estéril de la línea 25-2 en medio TA+IP₆ o en medio TAP. Así mismo, al comparar la adición del extracto estéril de la línea 25-2 con la del extracto estéril de la línea silvestre, o al no adicionar un extracto, no se observó una diferencia significativa en la concentración celular de la línea silvestre de *C. reinhardtii* al ser cultivada en medio TA+IP₆.

Con respecto a la acumulación de biomasa seca, en la Figura 3.9B se puede observar que el cultivo sin extracto en medio TAP tuvo un valor de 5.80 ± 0.45 g, el cual no tuvo una diferencia significativa al del cultivo sin extracto y con IP₆ (5.37 ± 0.32 g). Así mismo, al adicionar al cultivo el extracto de la línea silvestre en medio TAP se obtuvo una biomasa seca de 5.87 ± 0.25 g, el cual no tuvo una diferencia significativa con el valor obtenido al adicionar dicho extracto al medio TA+IP₆ (5.86 ± 0.30 g). También, al adicionar al cultivo el extracto de la línea 25-2 en medio TAP (5.83 ± 0.25 g), no se observó una diferencia significativa con el valor obtenido al adicionar este extracto al cultivo con IP₆ (5.46 ± 0.23 g).

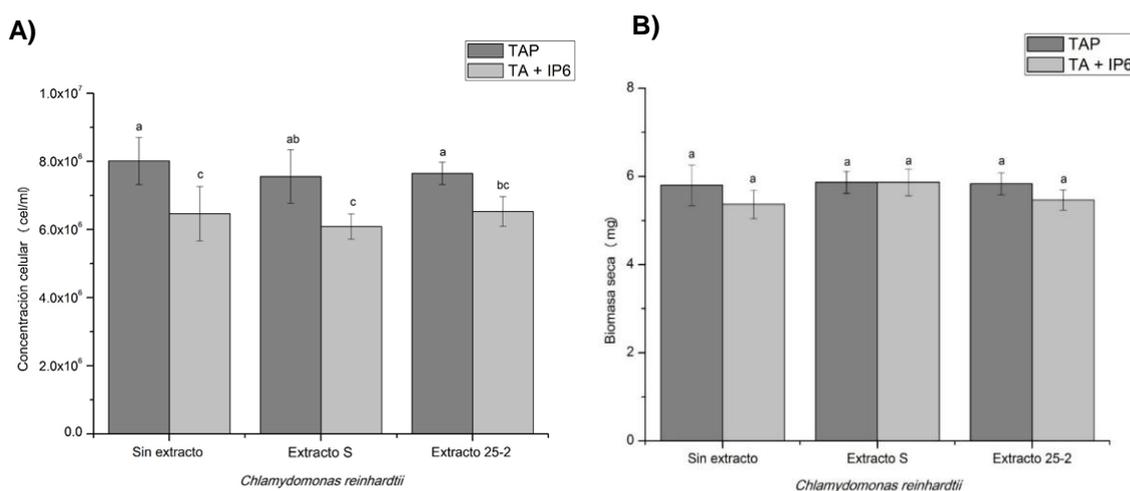


Figura 3.9 A) Concentración celular y B) biomasa seca de la línea silvestre de *C. reinhardtii* al evaluar el efecto del extracto estéril de la línea transplasmática 25-2 y de la línea silvestre (S) de dicha microalga en medio TAP y medio TA+IP₆.

3.4 DISCUSIÓN

A través de la comparación fenotípica de crecimiento de las cinco líneas transplastómicas y la línea silvestre de *C. reinhardtii*, se determinó que la línea 25-2 fue la de mayor concentración celular en los diferentes tratamientos con P (TAP y TA+IP₆). Esto probablemente esté relacionado con el tipo de morfología celular observado en el cultivo, el cual presentó un aglomerado característico y un tamaño celular mucho menor comparado a las demás líneas. Debido a su mayor crecimiento, la línea transplastómica 25-2 fue la cepa seleccionada para la obtención del extracto liofilizado y su utilización en los experimentos subsecuentes.

En este mismo experimento se obtuvieron evidencias que corroboran que la línea silvestre de *C. reinhardtii* es capaz de crecer en un medio suplementado exclusivamente con IP₆ como única fuente de P. Dicho resultado coincidió con lo reportado por Rivera-Solís y colaboradores (2013), donde mencionan que *C. reinhardtii* había sido capaz de crecer en un medio suplementado únicamente con IP₆ como fuente de P. Esto también había sido mencionado por Quisel y colaboradores (1996), sin embargo estos autores no presentaron evidencia de ello.

Por otra parte, se observó una baja concentración celular de la línea silvestre de *C. reinhardtii* al ser cultivada en medio TA+IP₆ que en medio TAP. Esto podría ser atribuido a que bajo este tratamiento, *C. reinhardtii* depende única y exclusivamente del P obtenido a partir de la desfosforilación del IP₆ por alguna fitasa endógena de la microalga (Rivera-Solís *et al.*, 2013). Por lo tanto, la disponibilidad de P, a través de la eficiencia de esta desfosforilación, no es la misma que al disponer fácilmente la cantidad de P que se tendría en el medio TAP. Así mismo, Maenz y colaboradores (1999) mencionan que a pH neutro, los cationes como el Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺ y Zn²⁺ inhiben en un 50% la actividad de la fitasa de *Aspergillus niger* sobre el IP₆, por lo que también cabe la posibilidad de que la baja concentración celular observada en el tratamiento se deba a una hidrólisis parcial del IP₆, provocada por la interferencia de los cationes presentes en el medio TA (pH = 7.00) con la actividad de las enzimas involucradas en dicha hidrólisis.

Por su parte, el IP₆ es un agente quelante de cationes minerales de significancia nutricional, como es el caso de K⁺ y Mg²⁺, así como de Ca²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺ y Cu²⁺ (López *et al.*, 2002). Este fenómeno podría ser la explicación del cambio de coloración observado entre los cultivos del medio TAP y los cultivos del medio TA+IP₆, ya que

dicha coloración es similar a los cultivos de *C. reinhardtii* deficientes en Zn^{+2} y Fe^{+2} (Kropat *et al.* 2002). Además, el efecto quelante del IP_6 podría estar afectando a las clorofilas al no permitirles unir el Mg^{+2} , el cual forma parte importante de estas moléculas (Urbano *et al.*, 2000). Por otro lado, Blevins (1999) menciona que para que se dé una correcta asimilación del Mg^{+2} , es necesario un nivel adecuado de P, que permita generar la cantidad suficiente de ATP para activar los canales permeables al Mg^{+2} y otras moléculas. Estas dos teorías podrían explicar satisfactoriamente la diferencia de coloración en el tratamiento suplementado con IP_6 ; sin embargo, serían necesarios otros estudios para resolver esta interesante cuestión en un futuro.

Por otra parte, las líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* al ser cultivadas en los diferentes tratamientos con P (TAP y TA+ IP_6), no presentaron una relación directamente proporcional entre la concentración celular y el peso de biomasa seca. Tal es el caso de la línea B3-3 que presentó el mayor PBS entre las líneas transplastómicas, no obstante, presentó una concentración celular menor que la línea 25-2. Mientras tanto, la línea 25-2 fue la cepa con mayor concentración celular pero con menor PBS en comparación a la línea B3-3. Por lo tanto, se cree que el aumento de PBS de la línea B3-3 podría deberse a la acumulación de metabolitos celulares bajo dichos tratamientos, mientras que la línea 25-2 probablemente presentó una reducción en el tamaño celular debido a la disminución en el rendimiento de biomasa. Resultados similares fueron reportados por Herrera-Valencia y colaboradores (2011) quienes determinaron el efecto de salinidad (NaCl) y/o deficiencia de nitrógeno (DN) en cultivos de *Chlorella saccharophila*. En ese trabajo se observó un aumento en la concentración celular en el tratamiento con NaCl, y una disminución significativa en el número de células bajo el tratamiento de DN. Sin embargo, observaron una disminución en el PBS en el tratamiento con NaCl y un aumento en el tratamiento de DN. Dichos resultados fueron comparados con el medio TAP completo (control). El aumento en el PBS en el tratamiento con DN fue por el aumento en la acumulación de lípidos causado por este tratamiento, mientras que el bajo PBS en el tratamiento de NaCl, aunque con la mayor concentración celular, se debió a una reducción en el tamaño celular debido a una disminución en el contenido de compuestos celulares causadas por la exposición al NaCl (Herrera-Valencia *et al.* 2011).

Yoon y colaboradores (2011) proporcionaron la primera evidencia de la expresión funcional de una fitasa microbiana en *C. reinhardtii*, y demostraron el concepto del uso de microalgas transgénicas como aditivo alimenticio para la entrega de enzimas

dietéticas sin necesidad de la purificación de proteínas. Para ello realizaron un proceso de lisis a una pasta celular transgénica por congelación en nitrógeno líquido, seguido de su descongelación a temperatura ambiente y por último su liofilización. Este preparado liofilizado lo denominaron como “clasato”, y fue adicionado como suplemento a la dieta de pollos de engorda, observando una reducción del 43% en la excreción de IP_6 en las heces, y un aumento en la liberación de Pi en un 41%, en comparación con las de los pollos alimentados sólo con la dieta basal.

Con base en dicho estudio, en el presente trabajo se obtuvo un extracto liofilizado o “clasato” de la cepa transplastómica 25-2 de *C. reinhardtii*, para determinar su efecto sobre el crecimiento de la línea silvestre de dicha microalga en presencia de IP_6 como única fuente de P. La finalidad del estudio fue determinar de forma indirecta la presencia de la enzima fitasa recombinante (*phyASr*) proveniente del extracto de la línea transplastómica, cuya adición a un cultivo de la línea silvestre ocasionaría un aumento en la disponibilidad de Pi debido a la actividad de la enzima en respuesta a la presencia del IP_6 en el medio, de tal manera que favoreciera el crecimiento de la línea silvestre de *C. reinhardtii* en un medio libre de sales de P.

Cheng y colaboradores (1999) reportaron que la localización de la actividad fitasa de la proteína *phyASr* de la bacteria *S. ruminantium*, está asociada a la superficie de la membrana celular externa. Por lo tanto, se cree que durante el proceso de esterilización por filtración ocurra una gran pérdida de la actividad de la proteína recombinante del extracto liofilizado de la línea 25-2, por lo que se sugirió evaluar el efecto de un extracto liofilizado estéril y uno no estéril sobre el crecimiento de la línea silvestre de *C. reinhardtii* en un medio suplementado con IP_6 .

No se observó un efecto significativo en el crecimiento de la línea silvestre de *C. reinhardtii*, al adicionar en medio TA+ IP_6 el extracto estéril de la línea 25-2, en comparación con la adición del extracto estéril de la línea silvestre o sin la adición de un extracto. Lo anterior se interpreta como la probable pérdida de la actividad de la enzima fitasa recombinante del extracto transplastómico durante el proceso de esterilización por filtración, por lo que se cree que al no estar presente dicha enzima, no se observó una respuesta de parte de ésta en presencia de IP_6 , por lo que únicamente se observó la posible actividad fitasa endógena de la línea silvestre de *C. reinhardtii*.

Mientras tanto, se observó un efecto significativo en el crecimiento de la línea silvestre

de *C. reinhardtii*, al adicionar en medio TA+IP₆ el extracto no estéril de la línea 25-2, en comparación con la adición del extracto no estéril de la línea silvestre o sin la adición de un extracto. Esto probablemente se deba a la respuesta de la enzima fitasa recombinante del extracto transplastómico en presencia de IP₆, más la probable desfosforilación por alguna fitasa endógena de la línea silvestre de *C. reinhardtii*. Sin embargo, debido a que fue un extracto no esterilizado, dichos tratamientos presentaron una ligera contaminación bacteriana, por lo que se sugiere corroborar dicho resultado, realizando otro estudio donde se obtenga un extracto liofilizado estéril o extracto de proteínas, donde se conserve la cantidad e integridad de las proteínas.

Por otra parte, se observó una mayor concentración celular de la línea silvestre de *C. reinhardtii*, al adicionar en medio TA+IP₆ el extracto no estéril de la línea silvestre, que al no adicionar un extracto. Esto resulta interesante, ya que esta diferencia quizá podría deberse a la presencia de la actividad fitasa endógena proveniente, tanto del extracto como del cultivo de la cepa silvestre de *C. reinhardtii*, lo que permitió favorecer su crecimiento a través de una mayor disponibilidad de P en el medio; comparado con solo la actividad endógena del cultivo de la microalga, al no adicionar el extracto.

Por otro lado, no se observó una diferencia significativa en el PBS en los cultivos de la línea silvestre de *C. reinhardtii*, tanto en medio TAP o como en medio TA+IP₆, a pesar de adicionar, o no, el extracto estéril de la línea 25-2 o el extracto estéril de la línea silvestre. La posible explicación a esto, y como se mencionó anteriormente, se debió a la pérdida de la actividad de las enzimas del extracto estéril, ya sea de la línea transplastómica o de la línea silvestre, ya que éstas al no estar disponibles, el cultivo no obtuvo un mayor aporte de metabolitos, y por lo tanto, no hubo un aumento de la biomasa, por lo que se observó únicamente la actividad enzimática endógena de la línea silvestre de la microalga.

Así mismo, no se observó una diferencia significativa en el PBS de la línea silvestre de *C. reinhardtii*, al adicionar en medio TAP el extracto no estéril de la línea 25-2 o el extracto no estéril de la línea silvestre, o al no adicionar un extracto. Sin embargo, al no estar adicionado con un extracto el medio TA+IP₆, el PBS de la línea silvestre de *C. reinhardtii* fue mucho menor, comparado con la adición del extracto no estéril de la línea 25-2 o con la adición del extracto no estéril de la línea silvestre. Esto último, probablemente se deba a que el tratamiento sin extracto no obtuvo un aporte extra de

enzimas con actividad fitasa provenientes del “clasato”, por lo que se cree que solo hubo una respuesta hacia el IP₆ a través de las enzimas endógenas de la microalga. Por lo tanto, al no haber un aumento en el aporte de componentes celulares durante el metabolismo, no hubo un aumento en el PBS en el cultivo.

3.5 CONCLUSIONES

1. La línea silvestre de *C. reinhardtii* fue capaz de crecer en un medio de cultivo con IP₆ como la única fuente de P presente, por lo que se sugiere que presenta al menos una fitasa endógena aún por ser caracterizada.
2. La línea 25-2 presentó la mayor concentración celular entre las cinco líneas transplastómicas de *C. reinhardtii*, tanto en medio TAP como en medio TA+IP₆. Por lo tanto, fue la cepa seleccionada para la obtención del extracto liofilizado (clasato).
3. Se observó un efecto significativo del extracto liofilizado no estéril de la línea 25-2 de *C. reinhardtii*, sobre el crecimiento de la línea silvestre de dicha microalga en presencia de IP₆. Sin embargo, los cultivos presentaron una ligera contaminación bacteriana, por lo que se sugiere repetir el estudio para su confirmación.
4. No se observó un efecto significativo del extracto liofilizado estéril de la línea 25-2 de *C. reinhardtii*, sobre el crecimiento de la línea silvestre de dicha microalga en presencia de IP₆, probablemente por la pérdida de la actividad de la proteína fitasa recombinante durante el proceso de esterilización.
5. No se observó ninguna diferencia significativa en el PBS en los cultivos de la línea silvestre de *C. reinhardtii*, al adicionar el extracto estéril o no estéril de la línea 25-2 a ambos tratamientos (TAP y TA+IP₆).

3.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Blevins, D.G. (1999). Why plants need phosphorus. *Better Crops*. 8 (2), 29-30.
- Cheng, K.J., B.L. Selinger, L.J. Yanke., H.D. Bae, L. Zhou y C.W. Forsberg, (1999). Phytases of ruminal microorganisms. US Patent Number: 5, 939, 303.
- Harris, E. (1989). The *Chlamydomonas* sourcebook. Academic New York.
- Hebeler, M., S. Hentrich, A. Mayer, D. Leibfritz y L.H. Grimme (1992). Phosphate regulation and compartmentation in *Chlamydomonas reinhardtii* studied by *in vivo* P-31-NMR. *Photosynthesis Research*. 34, 199.
- Herrera-Valencia, V.A., P.Y. Contreras-Pool, S.J. López-Adrián, S. Peraza-Echeverría, L.F. Barahona-Pérez (2011). The Green Microalga *Chlorella saccharophila* as a Suitable Source of Oil for Biodiesel Production. *Current Microbiology*. 63, 151 – 157.
- Kropat, J., A. Hong-Hermesdorf, D. Casero, P. Ent, M. Castruita, M. Pellegrini, S.S. Merchant y D. Malasarn (2011). A revised mineral nutrient supplement increases biomass and growth rate in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal*. 66(5), 770-780.
- López, H.W., F. Leenhardt, C. Coudray y C. Remesy (2002). Minerals and phytic acid interactions: is it a real problem for human nutrition?. *International Journal of Food Science & Technology*. 37(7), 727-739.
- Maenz, D.D., C.M. Engele-Schaan, R.W. Newkirk y H.L. Classen (1999). The effect of minerals and mineral chelators on the formation of phytase-resistant and phytase-susceptible forms of phytic acid in solution and in a slurry of canola meal. *Animal Feed Science and Technology*. 81(3-4), 177 – 192.
- Matagne, R.F., R. Loppes y R. Deltour (1976). Phosphatase of *Chlamydomonas reinhardtii*: biochemical and cytochemical approach with specific mutants. *Journal of Bacteriology*. 126(2), 937 – 950.
- Moseley, J.L., D. Gonzalez-Ballester, W. Pootakham, S. Bailey y A.R. Grossman (2009). Genetic interactions between regulators of *Chlamydomonas* phosphorus and sulfur deprivation responses. *Genetics*. 181(3), 889 – 905.

- Patni, N.J., S.W. Dhawale y S. Aaronson (1977). Extracellular phosphatases of *Chlamydomonas reinhardtii* and their regulation. *Journal of Bacteriology*. 130(1), 205 – 211.
- Quisel, J.D., D.D. Wykoff y A.R. Grossman (1996). Biochemical characterization of the extracellular phosphatases produced by phosphorus-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*. 111(3), 839 – 848.
- Riekhof, W.R., M.E. Ruckle, T.A. Lydic, B.B. Sears y C. Benning (2003). The sulfolipids 2'-O-acyl-sulfoquinovosyldiacylglycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol are absent from a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant deleted in SQD1. *Plant Physiology*. 133(2), 864 – 874.
- Rivera-Solís, R.A., Peraza S., Echeverría I. y Herrera V. (2013). *Chlamydomonas reinhardtii* has a small family of purple acid phosphatase homologue genes that are differentially expressed in response to phytase. *Annals of Microbiology*. 64(2), 551 – 559.
- Ruiz, F.A., N. Marchesini, M. Seufferheld, Govindjee y R. Docampo (2001). The polyphosphate bodies of *Chlamydomonas reinhardtii* possess a proton-pumping pyrophosphatase and are similar to acidocalcisomes. *Journal of Biological Chemistry*. 276, 46196 – 46203.
- Schachtman, D.P., R.J. Reid y S.M. Ayling (1998). Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell. *Plant Physiology*. 116(2), 447 – 453.
- Siderius, M., A. Musgrave, H. van den Ende, H. Koerten, P. Cambier y P. van der Meer (1996). *Chlamydomonas eugametos* (chlorophyta) stores phosphate in polyphosphate bodies together with calcium. *Journal of Phycology*. 32, 402–409.
- Theodorou, M.E. y W.C. Plaxton (1993). Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiology*. 101, 339 – 344.
- Urbano, G., M. López-Jurado, P. Aranda, C. Vidal-Valverde, E. Tenorio y J. Porres (2000). The role of phytic acid in legumes: antinutrient or beneficial function?. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 56(3), 283-294.
- Werner, T., N. Amrhein y F. Freimoser (2007). Inorganic polyphosphate occurs in the
-

cell wall of *Chlamydomonas reinhardtii* and accumulates during cytokinesis. *BMC Plant Biology*. 7(1), 51.

Yehudai-Resheff, S., S.L. Zimmer, Y. Komine and D.B. Stern (2007). Integration of Chloroplast Nucleic Acid Metabolism into the Phosphate Deprivation Response in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell Online*. 19(3), 1023 – 1038.

Yoon, S.M., S. Kim, K. Li, B. Yoon, S. Choe y M. Kuo (2011). Transgenic microalgae expressing *Escherichia coli appA* phytase as feed additive to reduce phytate excretion in the manure of young broiler chicks. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 91(3), 553 – 563.

CAPÍTULO IV

4.1 DISCUSIÓN GENERAL

Debido a la presencia de factores anti-nutricionales, como el fitato (IP_6), los animales monogástricos como aves, cerdos y peces, no son capaces de digerir eficientemente el alimento; esto se debe a que no son capaces de sintetizar las enzimas específicas para su hidrólisis, haciendo del fósforo (P) y otros elementos de valor nutricional pobremente disponible para su absorción. Por lo tanto, debido a la insuficiencia de P en la dieta, son usualmente adicionadas fuentes de fósforo inorgánico (Pi) a la alimentación de animales monogástricos, para asegurar que los requerimientos nutricionales sean cumplidos. Sin embargo, esta suplementación no solo es limitada, sino también se traduce en costos de alimentación adicional (Bedford y Partridge, 2010), ya que en la dieta de dichos animales, el P es el tercer nutriente más caro después de la suplementación de energía y proteína. Así mismo, al adicionar fuentes de Pi a la dieta, conlleva a que considerables cantidades de P de componentes de origen vegetal que no son aprovechados, sean excretados, dando como resultado los actuales problemas ambientales.

Las fitasas han sido bien reconocidas y documentadas por los beneficios que ofrece a la industria de la alimentación animal, en especial para animales de granja monogástricos. La identificación y el establecimiento de los beneficios adicionales de estas enzimas, por su capacidad de reducir el impacto negativo al ambiente, ha incrementado la competencia en el mercado. Las tendencias de crecimiento en el mercado de las fitasas estarán muy en línea con los patrones de demanda de alimentación, y una gran parte del crecimiento del mercado será de las especies animales tradicionales, aunque la acuicultura ofrece un nivel potencial (PR Newswire, 2015).

La tendencia actual en el mercado de las fitasas indica un incremento en la utilización de estas enzimas para satisfacer la demanda de P en el área pecuaria, en lugar del Pi de origen mineral, ya que el mercado de estas enzimas presentó ganancias de aproximadamente 4.4 mil millones de dólares en el año 2015, por lo que el mejoramiento de las fitasas conocidas mediante ingeniería genética y proteica, es uno de las metas próximas a alcanzar, ya que ninguna de las fitasas conocidas en la actualidad cumple con la eficiencia catalítica, la resistencia a proteólisis, termoestabilidad y economía necesarias para ser consideradas como un aditivo

alimenticio ideal (Yao *et al.*, 2012; Report Code: BIO030E, Published: January 2008, Report Code: BIO030F Published: January 2011). Por otro lado, la búsqueda de nuevas fitasas con características novedosas, es uno de los retos a cumplir en los próximos años.

Una fitasa que presenta características interesantes para ser expresada de forma heteróloga es la fitasa de *Selenomonas ruminantium*. Se observó que esta enzima tiene actividad en un rango de pH que va de 4.0 a 6.0 y a una temperatura de 37 °C en la cepa silvestre de *S. ruminantium* (Cheng *et al.*, 1999). Su masa molecular es de aproximadamente 39 KDa y su punto isoeléctrico (pI) calculado es de 8.54. Esta enzima ha sido sobreexpresada de manera recombinante en semillas de arroz, observándose actividad en un rango de pH que va de 3.0 a 5.5 con dos picos de actividad óptima en 3.0 y 5.0. La temperatura óptima en este caso fue de 60 °C (Hong *et al.*, 2004). Estas características la hacen muy atractiva para ser utilizada en aplicaciones industriales como la alimentación animal de los animales monogástricos en los cuales el pH de sus estómago se encuentra entre 2.0 y 3.0 en tanto que el pH de su intestino delgado, se encuentra a un pH de entre 4.0 y 7.0 (Cheng *et al.*, 1999). Aunque parámetros de pH y temperatura mencionadas anteriormente la hacen atractiva para su uso en la alimentación animal, el rendimiento obtenido tan solo fue del 0.5 % de proteína soluble total (PST), el cual no cumple con el 1 % necesario para que una proteína recombinante sea viable para su comercialización (Kusnadi *et al.*, 1997) por lo que es importante analizar otros sistemas de expresión como es el caso de *C. reinhardtii* para tratar de alcanzar el porcentaje de proteína necesario para su comercialización.

Basándonos en esta última aproximación, previamente en el laboratorio se generó un plásmido (*pChPhy*) que contiene el gen *phyASr* que se encuentra fusionado con el promotor *atpA* y el terminador *psbA*. Dicho gen codifica para la fitasa de la bacteria *S. ruminantium*. Esta construcción fue concebida como una herramienta que permitió la transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii* para su uso como biorreactor en la producción recombinante de esta fitasa (Rivera-Solís *et al.*, 2013).

Por lo tanto, en el presente trabajo se caracterizaron cinco líneas transplastómicas de esta microalga previamente generadas, para verificar la expresión del gen *phyASr* mediante RT-PCR de punto final y RT-PCR de tiempo real (qRT-PCR). Como resultados, se observó que todas las líneas transplastómicas expresaron el gen que

codifica a la enzima fitasa de *S. ruminantium* con un tamaño del amplicón de 246 pb, a excepción de la línea silvestre de *C. reinhardtii*. Debido a que todas las líneas transplastómicas expresaron el gen heterólogo a partir de los extractos de ARN, esto probablemente se deba a la regulación del P+5'UTR del gen *atpA* y la región 3'UTR del gen *psbA* del cloroplasto de *C. reinhardtii* (Rivera-Solís, 2013). Barnes y colaboradores (2005), mencionan que dichas regiones son unas de las mejores combinaciones para la acumulación de ARNm. Así mismo, según Rasala y colaboradores (2010) la traducción y la acumulación de ARNm están determinadas principalmente por la selección del promotor y la región reguladora, por lo que estos son factores críticos a considerar para lograr obtener un alto rendimiento de la proteína de interés.

Posteriormente, se determinaron los niveles de expresión del transgen de las líneas transplastómicas de *C. reinhardtii*. Existen dos métodos de análisis de datos para experimentos de PCR cuantitativa, los cuales son: la cuantificación absoluta y la cuantificación relativa (Livak y Schmittgen, 2001). En este caso no fue necesario determinar el número de copias absoluto del ácido nucleico, por lo que se consideró relevante determinar solo los niveles de expresión relativos del gen *phyASr* entre las cinco líneas transplastómicas de *C. reinhardtii*, bajo la detección del colorante fluorescente SYBR Green I. Para el análisis de expresión de dicho gen, las muestras fueron normalizadas bajo la expresión de un gen de referencia endógeno, en este caso se utilizó el gen *rpl16*, cuya expresión es constante en todas las muestras evaluadas. La normalización de las muestras mediante un gen de referencia endógeno proporciona un método de corrección de resultados en caso de alguna variación en la cantidad de ARN adicionado (Livak y Schmittgen, 2001).

Para el cálculo de la expresión relativa del gen *phyASr* se utilizó el método de $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Así mismo, se usó como muestra de referencia (control) la línea 13-1, debido a que fue la clona de menor expresión entre las líneas, y a su vez, permitió una mejor visualización de los datos. Por lo tanto, por definición esta muestra presenta un valor de $2^{-\Delta\Delta C_T}$ igual a 1.0 (Green y Sambrook, 2012; Livak y Schmittgen, 2001). Una vez normalizados los datos, las muestras fueron comparadas con la muestra de referencia, donde se observó que la línea B3-3 tuvo tres veces mayor expresión que la línea 13-1, mientras que las líneas 21-1, 25-2 y 29-7 tuvieron aproximadamente 2 veces mayor expresión que la línea 13-1. Sin embargo, las líneas 21-1 y 25-2 no presentaron una diferencia significativa con respecto a la muestra de referencia. Por lo tanto, la línea

B3-3 fue la de mayor nivel de expresión relativa en comparación a todas las líneas transplastómicas. Debido a que las condiciones de crecimiento de los cultivos fueron iguales entre las líneas, y se comprobó en estudios previos la homoplasmia de éstas, se esperó que las líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* presentaran niveles de expresión similares. No obstante, se piensa que esta diferencia de expresión se deba a lo mencionado por Surzycki y colaboradores (2009) quienes argumentan que probablemente los niveles de expresión dependen en mayor grado sobre la naturaleza de los cambios que se presentan durante los eventos de transformación individual en las líneas transformadas. Dichos cambios podrían ser resultado de la formación de una línea transformada que ahora presenta características únicas, o sufre una transformación asociada a modificaciones genotípicas, o también denominado transformosomas, lo que provoca una amplia variación en la acumulación de proteínas en las líneas transformadas “genéticamente idénticas” debido a probables cambios durante el proceso de transformación por biobalística o procesos de selección. Por lo tanto, también se esperaría que estos cambios afecten a otras características de las cepas transgénicas, tales como las tasas de crecimiento o la estabilidad de la proteína.

Yoon y colaboradores (2011) proporcionaron la primera evidencia de la expresión funcional de una fitasa microbiana en *C. reinhardtii*, y demostraron el concepto del uso de microalgas transgénicas como aditivo alimenticio para la entrega de enzimas dietéticas sin necesidad de la purificación de proteínas. Para ello, realizaron un proceso de lisis a una pasta celular transgénica por congelación en nitrógeno líquido, seguido de su descongelación a temperatura ambiente y por último su liofilización. Este preparado liofilizado lo denominaron como “clasato”, y fue adicionado como suplemento a la dieta de pollos de engorda, observando una reducción del 43% en la excreción de IP₆ en las heces, y un aumento en la liberación de Pi en un 41%, en comparación con las de los pollos alimentados sólo con la dieta basal.

Con base a dicho estudio, en el presente trabajo se generó un extracto liofilizado o “clasato” de una cepa transplastómica de *C. reinhardtii*, para evaluar su efecto de forma indirecta sobre el crecimiento de la línea silvestre de dicha microalga, la cual fue cultivada en diferentes tratamientos suplementados con IP₆ en presencia o ausencia de sales de P. Previamente, se realizó una comparación fenotípica de crecimiento de las líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* para seleccionar la línea con mayor concentración celular, y posteriormente, obtener el preparado liofilizado. Como resultado, se observó que la línea 23-3 fue la cepa con mayor concentración celular

entre las líneas transplastómicas, esto probablemente se deba al tipo de morfología celular observado en el cultivo, el cual presentó un aglomerado característico y un tamaño celular mucho menor comparado a las demás líneas. Por lo tanto, la línea 25-2 fue la cepa seleccionada para la obtención del extracto. Además, en este mismo estudio se presentan evidencias de que la línea silvestre de *C. reinhardtii* fue capaz de crecer en un medio suplementado exclusivamente con IP₆ como única fuente de P, por lo que se sugirió que la microalga presenta al menos una fitasa endógena. Dicho resultado coincidió con lo reportado por Rivera-Solís y colaboradores (2013), donde mencionan que *C. reinhardtii* había sido capaz de crecer en un medio suplementado únicamente con IP₆ como fuente de P presente. Esto también fue reportado por Quisel y colaboradores (1996), sin embargo no presentan evidencia de ello.

Cheng y colaboradores (1999) reportaron que la localización de la actividad fitasa de la proteína *phyASr* de la bacteria *S. ruminantium*, está asociada a la superficie de la membrana celular externa. Por lo tanto, se cree que durante el proceso de esterilización por filtración ocurrió una gran pérdida de la actividad de la proteína recombinante del extracto liofilizado de la línea 25-2, por lo que se sugirió evaluar el efecto de un extracto liofilizado estéril y no estéril sobre el crecimiento de la línea silvestre de *C. reinhardtii* en un medio suplementado con IP₆. También se consideró obtener un extracto liofilizado estéril o no estéril de la cepa silvestre de *C. reinhardtii* como control negativo.

No se observó un efecto significativo en el crecimiento de la línea silvestre de *C. reinhardtii*, al adicionar en medio TA+IP₆ el extracto estéril de la línea 25-2, en comparación con la adición del extracto estéril de la línea silvestre o sin la adición de estos. Lo anterior se interpreta como la probable pérdida de actividad de la enzima fitasa recombinante del extracto transplastómico durante el proceso de esterilización, por lo que se cree que al no estar presente la actividad dicha enzima, no se observó una respuesta de parte de ésta en presencia de IP₆, por lo que únicamente se observó la posible actividad fitasa endógena de la línea silvestre de *C. reinhardtii*.

Mientras tanto, se observó un efecto significativo en el crecimiento de la línea silvestre de *C. reinhardtii*, al adicionar en medio TA+IP₆ el extracto no estéril de la línea 25-2, en comparación con la adición del extracto no estéril de la línea silvestre o sin la adición de un extracto. Esto probablemente se deba a la respuesta de la enzima fitasa recombinante del extracto transplastómico en presencia de IP₆, más la probable

desfosforilación por alguna fitasa endógena de la línea silvestre de *C. reinhardtii*. Sin embargo, debido a que fue un extracto no esterilizado, dichos tratamientos presentaron una ligera contaminación bacteriana, por lo que se sugiere corroborar dicho resultado.

4.2 CONCLUSIONES GENERALES

1. A diferencia de la línea silvestre, todas las líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* expresaron el gen *phyASr* que codifica a la enzima fitasa de *S. ruminiantum*.
2. Entre las líneas transplastómicas de *C. reinhardtii*, la línea B3-3 fue la que presentó mayor nivel de expresión relativa del gen *phyASr*.
3. La línea 25-2 presentó la mayor concentración celular entre las cinco líneas transplastómicas de *C. reinhardtii*, tanto en medio TAP como en medio TA+IP₆. Por lo tanto, fue la cepa seleccionada para la obtención del extracto liofilizado (clasato).
4. La línea silvestre de *C. reinhardtii* fue capaz de crecer en un medio de cultivo con IP₆ como la única fuente de P, por lo que se sugiere que presenta al menos una fitasa endógena, aún por ser caracterizada.
5. Se observó un efecto significativo del extracto liofilizado no estéril de la línea 25-2 de *C. reinhardtii*, sobre el crecimiento de la línea silvestre de dicha microalga en presencia de IP₆. Sin embargo, los cultivos presentaron una ligera contaminación bacteriana, por lo que se sugiere repetir el estudio para su confirmación.
6. No se observó un efecto significativo del extracto liofilizado estéril de la línea 25-2 de *C. reinhardtii*, sobre el crecimiento de la línea silvestre de dicha microalga en presencia de IP₆, probablemente por la pérdida de la actividad de la proteína fitasa recombinante durante el proceso de esterilización.

4.3 PERSPECTIVAS

En este trabajo se evaluó la expresión del gen *phyASr* a nivel de ARN mensajero de cinco líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* previamente generadas en el laboratorio. En dicho estudio se tiene evidencia de que todas las líneas presentaron el gen heterólogo de la bacteria *S. ruminantium*, a excepción de la línea silvestre de *C. reinhardtii*. Mientras que al realizar la cuantificación relativa del gen por RT-PCR de tiempo real, se observó que la línea transplastómica B3-3 fue la que presentó el mayor nivel de expresión relativa entre las líneas transplastómicas. Una vez obtenidos estos resultados, se consideró en un futuro realizar la cuantificación absoluta del gen *phyASr* para la confirmación de los resultados.

Por otra parte, se evaluó indirectamente la expresión del gen *phyASr* a nivel de proteína mediante la determinación del efecto del extracto liofilizado estéril y no estéril de la línea transplastómica 25-2 de *C. reinhardtii*, sobre el crecimiento de la línea silvestre de dicha microalga en un medio suplementado con IP_6 como única fuente de P. En este estudio se observó un efecto significativo en el crecimiento de la línea silvestre de *C. reinhardtii* al adicionar el extracto liofilizado no estéril de la línea 25-2, mientras que al adicionar el extracto liofilizado estéril de dicha línea no se observó un efecto significativo, posiblemente por una pérdida de la actividad de la proteína recombinante durante el proceso de esterilización por filtración. No obstante, cuando se adicionó el extracto no estéril se observó una ligera contaminación en los cultivos, por lo que se consideró necesario obtener un extracto de proteínas estéril de la línea transplastómica 25-2, donde se mantenga la integridad y concentración de la proteína. Por consiguiente, será interesante evaluar de forma indirecta el uso del Pi liberado por la microalga durante la desfosforilación del IP_6 , ésto mediante el análisis cualitativo del material genético de los cultivos. Una vez identificada la actividad de la enzima por el método indirecto, será importante realizar el ensayo enzimático de la fitasa recombinante de las cinco líneas transplastómicas por el método de Zimograma. También sería muy informativo evaluar la acumulación de la proteína recombinante en la cinco líneas transplastómicas mediante un Western blot.

Al ser esta microalga un organismo inocuo, sería interesante realizar ensayos *in vivo* con la posibilidad de dosificar directamente a partir de la biomasa seca que contiene a la fitasa recombinante, con la ventaja adicional de que el producto generado sería

considerado cisgénico, es decir que los genes, promotores y regiones reguladoras forman parte del organismo por lo que no se considera que modifiquen el contenido génico del organismo transformado (Schouten *et al.*, 2006), lo cual facilitaría su aceptación en el mercado. El objetivo del estudio sería demostrar la actividad de la fitasa recombinante como aditivo alimenticio a partir de las líneas transgénicas de *C. reinhartii* sin necesidad del proceso de purificación de la proteína.

4.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barnes, D., S. Franklin, J. Schultz, et al. (2005). Contribution of 5'- and 3'-untranslated regions of plastid mRNAs to the expression of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast genes. *Molecular Genetics and Genomics*. 274, 625 – 636.
- Bedford, M.R. y Partridge G.G. (2010). *Enzymes in farm animal nutrition*. MPG Books Group, Bodmin, UK. 1 – 6 p.
- Cheng, K.J., B.L. Selinger, L.J. Yanke., H.D. Bae, L. Zhou y C.W. Forsberg, (1999). Phytases of ruminal microorganisms. US Patent Number: 5, 939, 303.
- Green, M.R. y J. Sambrook (2012). Quantification of DNA and RNA by Real-Time PCR, in: *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y. pp. 661.
- Hong, C.Y., K.J. Cheng, T.H. Tseng, C.S. Wang, L.F. Liu y S.M. Yu (2004). Production of two highly active bacterial phytases with broad pH optima in germinated transgenic rice seeds. *Transgenic Research*. 13(1), 29-39.
- Kusnadi, A.R., Z.L. Nikolov y J.A. Howard (1997). Production of recombinant proteins in transgenic plants: Practical considerations. *Biotechnology and Bioengineering*. 56(5), 473 – 484.
- Livak, K.J. y T.D. Schmittgen (2008). Analyzing of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25, 402 – 408.
- PR Newswire (2015) Strategic Analysis of the Global Market for Phytase for Animal Feed Applications: Growth is Expected but Increasing Competition Means Innovation will be Key to Market Growth [Online] (Actualizado 31 Diciembre 2015) Disponible en: <http://www.prnewswire.com/news-releases/strategic-analysis-of-the-global-market-for-phytase-for-animal-feed-applications-300198242.html> [Acceso Enero 2016].
- Quisel, J.D., D.D. Wykoff y A.R. Grossman (1996). Biochemical characterization of the extracellular phosphatases produced by phosphorus-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*. 111(3), 839 – 848.
- Rasala, B.A., M. Muto y P.A. Lee, et al. (2010). Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of
-

Chlamydomonas reinhardtii. Plant Biotechnology Journal. 8, 1 – 15.

Rivera-Solís, R.A., Peraza S., Echeverría I. y Herrera V. (2013). *Chlamydomonas reinhardtii* has a small family of purple acid phosphatase homologue genes that are differentially expressed in response to phytase. Annals of Microbiology. 64(2), 551 – 559.

Rivera-Solís, R.A. (2013). Caracterización molecular de secuencias homólogas a fosfatasas ácidas púrpura en *Chlamydomonas reinhardtii* y generación de un plásmido recombinante para la expresión de una fitasa en el cloroplasto de esta microalga (tesis de doctorado). Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Yucatan, México.

Schouten, H.J.K. y Frans A; Jacobsen, Evert (2006). Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants. EMBO Rep. 7(8), 750-753.

Surzycki R., K. Greenham, K. Kitayama, F. Dibal, R. Wagner, J.D. Rochaix, T. Ajam y S. Surzycki (2009). Factors effecting expression of vaccines in microalgae. Biologicals. 37, 133 – 138.

Yao, M.Z., Y.H. Zhang, W. L. Lu, M. Q. Hu, W. Wang y A.H. Liang (2012). Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications. Journal of Applied Microbiology. 112(1), 1-14.

Yoon, S.M., S. Kim, K. Li, B. Yoon, S. Choe y M. Kuo (2011). Transgenic microalgae expressing *Escherichia coli appA* phytase as feed additive to reduce phytate excretion in the manure of young broiler chicks. Applied Microbiology and Biotechnology. 91(3), 553 – 563.